



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE**

**PROSTAGLANDINA F₂ α COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM BOVINOS E
BUBALINOS CRIADOS NO BIOMA AMAZÔNIA**

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO

Porto Velho (RO)
2015



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE**

**PROSTAGLANDINA F2 α COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM BOVINOS E
BUBALINOS CRIADOS NO BIOMA AMAZÔNIA**

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO

Orientador: Dr. Luiz F. M. Pfeifer

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Consultar a bibliotecária Daniela Maciel Pinto

C355p

Castro, Natalia Ávila de.

Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em bovinos e bubalinos criados no Bioma Amazônia / Natalia Ávila de Castro, 2015.

62 f.

Orientador: Luiz Francisco M. Pfeifer

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)- Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

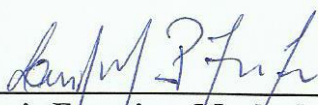
1. Fertilidade animal. 2. Inseminação artificial - Ovulação. 3. Bovinocultura Leiteira. 4. Bubalinocultura. 5. Prostaglandina F2 α . I. Fundação Universidade Federal de Rondônia.

CDD (21.ed.) 636.0824

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO

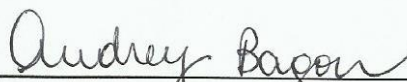
**“PROSTAGLANDINA F2a COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM BOVINOS E
BUBALINOS CRIADOS NO BIOMA AMAZÔNIA”.**

Comissão Examinadora



Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dra. Audrey Bagon
Membro

Faculdades Integradas Aparício Carvalho



Dra. Ana Karina Dias Salman
Membro

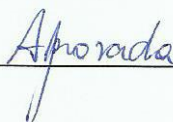
Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dra. Michelliny de Matos Bentes Gama
Suplente

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Porto Velho, 7 de Janeiro de 2015.

Resultado:



AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por toda a sua bondade e misericórdia; por me conceder a oportunidade desta existência, com saúde; por todo mal tirado do meu caminho e pela belíssima oportunidade a mim concedida de realizar este mestrado em um local tão oportuno e junto de pessoas tão importantes para a minha caminhada;

Ao meu pai Jairo Silva de Castro, por todo o amor e atenção, por não me deixar faltar nada e por acreditar sempre em mim; e a Sandra, por todo amor e companheirismo ao meu pai, e por ter nos adotado, apesar das dificuldades, com toda generosidade e também muito amor;

Ao meu orientador Luiz F. M. Pfeifer, pela orientação durante todas as etapas do mestrado, pela confiança em mim depositada, por todos os valiosos conselhos, que certamente contribuíram para a minha formação profissional; e também por todo carinho com que me recebeu, pela atenção e preocupação. Por se revelar um verdadeiro amigo, a quem devo muito e poderá sempre contar comigo;

À minha avó Maria, por toda dedicação para comigo e meu irmão em todos os momentos de maior dificuldade para a família; e ao meu avô Giasone pela alegria de todos os dias, pela leveza com que encara cada dia;

À minha tia Jonci, por todo suporte, pela força e exemplo de mulher, em quem busco me espelhar e ao meu tio Jaldo, pela pureza de coração e por todo carinho dedicado a todos.

Ao meu irmão Rodrigo e ao meu primo Rômulo, por fazerem parte essencial da minha caminhada; e ao meu primo Júlio e ao meu amado afilhado Arthur;

A amiga Audrey Bagon, por toda amizade, carinho, ajuda nos experimentos e principalmente por todo o apoio durante estes dois anos;

À Embrapa – Rondônia, por ceder as instalações para que os experimentos fossem realizados;

Aos amigos encontrados na Embrapa – Rondônia, por todo o auxílio durante esta estadia em Porto Velho, pela receptividade; especialmente a Juliana Dias e a Ana Karina Salman, pela amizade e ao pesquisador Eduardo Schmitt, pelo auxílio durante os experimentos, disposto a ajudar, mesmo em dias e horários de seu descanso;

Aos estagiários Gabriela, Vitor, Karol, Paulo Marcos (PM), pelo o auxílio e dedicação no cumprimento das atividades; e também aos funcionários do campo experimental da Embrapa, Ricardo, Marcelo, Ribamar e seu Adalto, por colaborarem na execução dos experimentos;

A todos, e àqueles que não mencionei, mas de alguma forma me ajudaram durante esse período, a minha sincera gratidão!

RESUMO

A Prostaglandina F2 α (PGF), amplamente utilizada em protocolos de sincronização de cio por sua ação luteolítica, tem demonstrado também induzir a ovulação de fêmeas bovinas. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de um análogo da PGF (d-Cloprostenol) como indutor de ovulação em diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo-fixo para bovinos e bubalinos. Para a elaboração da dissertação de mestrado, foram realizados cinco experimentos que estão descritos em dois artigos científicos, os quais serão submetidos para publicação. O objetivo do Artigo 1 foi avaliar a eficiência de um análogo de PGF como indutor de ovulação em búfalas e vacas leiteiras. A hipótese testada foi de que a Prostaglandina induz a ovulação tanto em fêmeas bovinas, como em bubalinas. Dessa forma, três experimentos foram conduzidos, sendo um com búfalas e dois com vacas, ambas em lactação. As fêmeas foram submetidas a protocolos de sincronização de ovulação baseados no uso de estradiol e progesterona para induzir a nova onda folicular e prostaglandina (PGF), como agente luteolítico no momento da retirada do implante de progesterona. No dia da indução da ovulação, as fêmeas receberam d-Cloprostenol (Grupo PGF) ou Solução salina (0,9% de NaCl; Grupo CTL). Avaliações ultrassonográficas foram realizadas para detectar o momento da ovulação de cada fêmea. Com base nos resultados obtidos, constatou-se que nossa hipótese foi parcialmente comprovada, uma vez que a PGF antecipou a ovulação em vacas lactantes, entretanto, os efeitos não foram conclusivos em búfalas lactantes. O Artigo 2 teve como objetivos: 1) avaliar se a Prostaglandina F2 α (PGF) pode substituir o ciproionato de estradiol (ECP) usado para induzir a ovulação em um protocolo hormonal a base de GnRH e progesterona e 2) determinar se a antecipação da dose luteolítica da PGF seria capaz de potencializar a sua ação ovulatória em um protocolo livre de estradiol. A hipótese foi de que a PGF induz a ovulação de vacas e novilhas submetidas a protocolos livres de estradiol. Dois experimentos foram conduzidos com vacas e novilhas mestiças (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*). As avaliações ultrassonográficas foram feitas da mesma forma que nos Experimentos do Artigo 1. No Experimento 1, as fêmeas foram tratadas com PGF (Grupo PG), ECP (Grupo ECP) ou NaCl (Grupo CTL) no momento da indução da ovulação. Os resultados obtidos neste Experimento sugerem que, apesar dos indutores hormonais PGF e ECP não diferirem do grupo Controle, o uso de PGF em vacas lactantes tendeu a aumentar a sincronia das ovulações em relação aos animais que não foram induzidos a ovular. No Experimento 2, todas as vacas receberam a dose luteolítica da PGF 24 horas antes da remoção do implante de progesterona e no dia dos tratamentos para induzir a ovulação, um grupo recebeu d-Cloprostenol (Grupo PG) e o outro recebeu NaCl (Grupo CTL). Os resultados demonstraram que a PGF aumentou a taxa de ovulação em comparação com o Grupo que não recebeu estímulo ovulatório, além disso, houve uma tendência de maior sincronia das ovulações no Grupo que recebeu PGF. Com base nos resultados obtidos, concluímos que Prostaglandina F2 α antecipa a ovulação em vacas lactantes, além disso, ela pode ser utilizada em protocolos livres de estradiol. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para avaliar o seu uso em fêmeas bubalinas.

Palavras-chave: Fertilidade, PGF, Vacas leiteiras.

ABSTRACT

Prostaglandin F2 α (PGF), widely used in estrous synchronization protocols for its luteolytic function. Moreover, PGF has demonstrated to induce ovulation in bovine females. The aim of this study was to evaluate the use of PGF-analogue (d-Cloprostenol) as ovulatory stimulus in different timed artificial insemination (TAI) protocols in cattle and buffaloes. In this Master of Science thesis, five experiments were performed, which are described in two manuscripts, which will be submitted to publication. The aim of the Study 1 was to evaluate the efficiency of a PGF analogue as ovulatory stimulus in buffaloes and dairy cows. The hypothesis tested was that the Prostaglandin induces ovulation in both cows and buffaloes. Thus, three experiments were performed, one with lactating buffaloes and two with lactating cows. Females were subjected to ovulation synchronization protocols based on the use of estradiol and progesterone to induce new follicular wave and prostaglandin (PGF) as luteolytic agent in the time of withdrawal of progesterone device. On Day 9, the females were given d-Cloprostenol (PGF Group) or saline (0.9% NaCl; CTL Group). Ultrasounds exams were performed to detect the time of ovulation. Based on the results, it was found that our hypothesis was partially confirmed, since the PGF anticipated ovulation in lactating cows, however, the effects were not conclusive in lactating buffaloes. The aims of the Study 2 were: 1) to evaluate if Prostaglandin F2 α (PGF) can replace estradiol cypionate (ECP) used as ovulatory stimulus in a GnRH-progesterone based protocol, and; 2) to determine whether the anticipation of luteolytic dose of PGF would be able to improve its ovulatory action in a free estradiol protocol. The hypothesis was that the PGF induces ovulation of cows and heifers to free estradiol protocols. Two experiments were conducted with cows and crossbred Girolando heifers (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*). Ultrasound evaluations were performed similarly as in Experiments of Study 1. In Experiment 1, the females were treated with PGF (PG Group), ECP (ECP Group) or NaCl (CTL Group) 1 d after CIDR removal. Results suggest that, although the ovulatory stimuli, PGF and ECP, did not differ from the Control Group, the use of PGF tended to increase the synchronization of ovulation in comparison to females which were not induced to ovulate. In Experiment 2, all cows received a luteolytic dose of PGF, 24 h before progesterone device removal. The ovulatory treatments, d-Cloprostenol (PG group) and NaCl (CTL Group) were given 1 d after CIDR removal. The results demonstrated that PGF increased ovulation rate compared with the CTL group. In addition, there was a trend toward greater synchronization of ovulation for PGF Group. Based on these results, we conclude that Prostaglandin F2 α hasten ovulation in dairy cattle, moreover, it can be used in free estradiol protocols. However, more studies should be performed to evaluate its use in buffalo females.

Keywords: Fertility, PGF, Dairy cows.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE = Benzoato de estradiol

CC = Condição corporal

CL = Corpo lúteo

DPP = Dias pós-parto

eCG = Gonadotrofina coriônica equina

ECP = Cipionato de estradiol

FD = Folículo dominante

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas

IATF = Inseminação artificial em tempo-fixe

LH = Hormônio luteinizante

P4 = Progesterona

PGF = Prostaglandina F2 α

VE = Valerato de estradiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho ilustrativo dos protocolos hormonais de sincronização de cio e IATF *Ovsynch*, *Co-Synch* e *Heatsynch* utilizados em bovinos. 20

ARTIGO 1.

Figura 1. Desenhos experimentais utilizados nas (A) búfalas do Experimento 1 (n=16), (B) vacas do Experimento 2 (n=16) e (C) vacas do Experimento 3 (n = 16). 30

Figura 2. Distribuição e porcentagem de (A) búfalas do Experimento 1 e vacas do (B) Experimento 2 e (C) do Experimento 3 que ovularam após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona nos Grupos PGF e CTL..... 35

ARTIGO 2.

Figura 1. Desenho experimental utilizado nas (A) novilhas e vacas leiteiras do Experimento 1 e (B) vacas leiteiras do Experimento 2. 44

Figura 2. Porcentagem e distribuição do momento da ovulação de fêmeas *Bos taurus* vs. *Bos indicus* leiteiras tratadas com (A) 2 mL de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 25), 500µg de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) e 600µg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de cipionato no Experimento 2 e (B) 2 ml de NaCL 0,9% (Grupo CTL, n = 7) ou 500 µg de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 8)..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indicação do período de carência informado na bula de produtos comerciais feitos à base de análogos de 17- β Estradiol.	22
--	----

ARTIGO 1.

Tabela 1. Percentagem de búfalas (Experimento 1) e vacas (Experimento 2 e Experimento 3) que ovularam durante os tratamentos, taxa de ovulação sincronizada, média (\pm Erro Padrão) do momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e do diâmetro do folículo ovulatório nas fêmeas que receberam tratamento com PGF (Grupo PGF) ou nenhum tratamento (Grupo CTL) 24 horas após a remoção do implante intravaginal de progesterona.....	32
--	----

ARTIGO 2.

Tabela 1. Momento da ovulação, taxas de ovulação e de ovulação sincronizada e diâmetro do folículo ovulatório em vacas e novilhas leiteiras tratadas com 2 ml de NaCl a 0,9% (Grupo CTL, n = 25), 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) e 0,6 mg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de Cipionato de estradiol (Grupo ECP, n = 23)	45
--	----

Tabela 2. Porcentagem de vacas que ovularam durante o tratamento, percentagem de ovulações sincronizadas, momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e diâmetro do folículo ovulatório em vacas que receberam tratamento com PGF (Grupo PG, n = 8) ou 2 ml de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 7).	46
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. GERAL	14
2.2. ESPECÍFICOS.....	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1. CONTROLE EXÓGENO DO CICLO ESTRAL DE BOVINOS E BUBALINOS .	14
3.1.1. Breve histórico.....	14
3.1.2. Vantagens	15
3.1.3. Limitações	16
3.2. INDUTORES DE OVULAÇÃO	16
3.3. ASSOCIAÇÃO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL E PROGESTERONA	18
3.4. PROTOCOLOS A BASE DE GNRH	19
3.5. LIMITAÇÕES DO USO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL EM PRODUÇÃO ANIMAL	21
3.6. A DUPLA FUNÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS	23
4. ARTIGO 1	25
Resumo	25
Abstract.....	26
Introdução	26
Material e Métodos	28
<i>Experimento 1</i>	28
<i>Experimento 2</i>	28
<i>Experimento 3</i>	29
<i>Avaliações Ultrassonográficas e Definições</i>	29

<i>Análises estatísticas</i>	30
Resultados	31
<i>Experimento 1</i>	31
<i>Experimento 2</i>	31
<i>Experimento 3</i>	31
Discussão	32
Referências.....	36
5. ARTIGO 2.....	40
<i>Resumo</i>	40
<i>Abstract</i>	41
Introdução	41
Material e Métodos	43
<i>Experimento 1</i>	43
<i>Experimento 2</i>	43
<i>Avaliações Ultrassonográficas e Definições</i>	44
<i>Análises estatísticas</i>	44
Resultados	45
<i>Experimento 1</i>	45
<i>Experimento 2</i>	46
Discussão	47
Referências.....	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. REFERÊNCIAS GERAIS	55

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é responsável por 22,74% do PIB no Brasil (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, 2011). Neste âmbito, a atividade pecuária contribui com uma fatia considerável deste segmento, com aproximadamente 211 milhões cabeças de gado (FAOSTAT, 2012). Deste efetivo, cerca de 17% é destinado a produção de leite, a qual foi de 32,304 bilhões de litros de leite em 2012, colocando o Brasil no sexto lugar mundial em produção do leite (FAOSTAT, 2012). O valor bruto da produção dos dois segmentos da pecuária é estimado em R\$ 67 bilhões, sendo esse valor, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidências da importância econômica e social da bovinocultura em nosso país.

A região norte do Brasil, embora não seja considerada grande produtora de leite no país, produziu 1,7 bilhões de litros de leite em 2012, sendo o estado de Rondônia, o maior produtor da região, responsável por 42% da produção (IBGE, 2012). A produção leiteira de Rondônia não representa tanta importância nacional se comparada às regiões sul e sudeste, entretanto essa produção vêm crescendo nos últimos anos, como resultado de um aumento quantitativo e qualitativo dos rebanhos. Em relação a produção de bubalinos, na última década, o rebanho mundial, atualmente estimado em 195 milhões de cabeças, aumentou cerca de 15%, com um aumento na produção de leite de aproximadamente 35% (FAOSTAT, 2011). No Brasil, o rebanho é composto por aproximadamente 1,15 milhão de bubalinos, sendo a maior produção encontrada na região norte, responsável por cerca de 70% da produção total de búfalos do país (MAPA, 2011). Embora o rebanho bubalino brasileiro seja consideravelmente menor em comparação com o bovino, essa produção representa uma importante fonte de renda em determinadas regiões, especialmente o norte, em que a proporção de bubalinos é consideravelmente maior do que no resto do país.

O aumento produtivo dos rebanhos é uma crescente preocupação, especialmente neste momento, em que a busca por práticas sustentáveis têm incentivado pesquisadores a desenvolver tecnologias que permitam produzir cada vez mais em menores extensões de terra, com menos insumos. Neste sentido, o manejo reprodutivo, sendo um importante fator associado com a rentabilidade da pecuária bovina e que afeta diretamente a produtividade de um rebanho, deve ser eficiente para que a propriedade leiteira seja sustentável. Neste âmbito, quanto mais tecnificado for o sistema de produção, principalmente quando biotécnicas da reprodução como inseminação artificial (IA) e controle farmacológico do ciclo estral, maior

será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva. Apesar da disponibilidade dessas biotecnologias, a eficiência reprodutiva e consequentemente a rentabilidade dos sistemas de produção tanto de bovinos de corte quanto de leite, no Brasil, ainda é considerada baixa quando comparado a países desenvolvidos. Uma das formas de tornar o Brasil um país mais competitivo na produção produtos de origem animal é através do aumento dos índices reprodutivos e do mérito genético do rebanho. Para tanto, ferramentas reprodutivas como a inseminação artificial em associação com o controle farmacológico do ciclo estral permitem que fêmeas sejam inseminadas em momentos mais adequados, facilitando assim, o manejo e a disseminação da IA e o aumento do mérito genético dos animais comercializados.

Neste sentido, existe uma grande variedade de protocolos de sincronização de ovulação comprovadamente eficientes para bovinos e quem vem sendo testados e aplicados também em bubalinos (BARUSELLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001; CAMELO, 2002; BARUSELLI & CARVALHO, 2005; ROLIM FILHO et al., 2009) com algumas alterações para que sejam respeitadas as particularidades de cada espécie. Grande parte dos protocolos, especialmente os aplicados no Brasil, utilizam ésteres de estradiol, por apresentar boa eficiência e baixo custo. Entretanto diversos países proibiram o uso deste hormônio em produção animal devido ao seu poder residual, sendo relacionado com o desenvolvimento de tumores em humanos que ingerem alimentos contendo estes resíduos.

Muitos dos países que proíbem o uso de estradiol são importantes importadores dos produtos brasileiros, dessa forma, é necessário estudar alternativas que possam substituir o uso de ésteres de estradiol, sem que a fertilidade dos animais seja prejudicada, e garantindo a seguridade para humanos que ingerem produtos de origem animal. Além disso, a retirada do estradiol dos protocolos evitaria que os nossos produtos sofram embargos dos mercados mais exigentes. Neste sentido, sabe-se que os análogos de Prostaglandina F_{2α} (PGF), amplamente utilizados em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF) por seu efeito luteolítico, possui ação direta sobre a ovulação (SILVA & REEVES, 1985; ALGIRE et al., 1992; BRIDGES & FORTUNE, 2007). Além disso, estudos já demonstraram que a aplicação exógena de d-Cloprostenol (análogo de PGF) induz a primeira ovulação em novilhas de corte (PFEIFER et al., 2009; LEONARDI et al., 2012), sendo mais recentemente demonstrado que a PGF antecipa a ovulação em novilhas púberes submetidas a sincronização de ovulação e em vacas lactantes, produzindo resultados semelhantes aos alcançados com o uso de ésteres de estradiol, sem prejudicar a fertilidade (PFEIFER et al., 2014). Apesar da PGF ser uma alternativa para substituir os ésteres de estradiol como indutor de ovulação, ainda não há

estudos que demonstrem o efeito da PGF em protocolos livres de estradiol. Além disso, em bubalinos não existem estudos que comprovem a eficácia da PGF sobre a ovulação.

Baseado nessas considerações, os estudos que fazem parte da dissertação de mestrado foram realizados para avaliar a eficiência da PGF como indutor de ovulação em protocolos de sincronização de cio e IATF. Para tanto, foram desenvolvidos, durante o período de fevereiro de 2013 a abril de 2014, cinco experimentos baseados na adaptação de protocolos utilizados em fêmeas bovinas e bubalinas. Os experimentos estão dispostos em dois artigos científicos, que serão submetidos para publicação.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Determinar o efeito de um análogo de Prostaglandina F2 α (d-Cloprostenol) como indutor de ovulação em protocolo utilizados em fêmeas leiteiras bovinas e bubalinas.

2.2. ESPECÍFICOS

- determinar o efeito da PGF como indutor de ovulação em búfalas leiteiras;
- avaliar o perfil ovulatório de vacas e novilhas leiteiras tratadas com um análogo de PGF em comparação com o ECP usado no protocolo *Heatsynch*;
- avaliar se a antecipação da luteólise melhora a sincronização da ovulação em protocolos livres de estradiol que usam a PGF como indutor de ovulação.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CONTROLE EXÓGENO DO CICLO ESTRAL DE BOVINOS E BUBALINOS

3.1.1. Breve histórico

Os primeiros estudos acerca do controle do ciclo estral foram realizados no início da década de 40, em que observou-se que repetidas injeções de progesterona por 14 dias apresentavam alta taxa de expressão de cio, entretanto, a fertilidade não era potencializada (JOCHLE, 1993). Nos anos 50, vários progestágenos, administrados por via oral, passaram a substituir as repetidas injeções de progesterona (ZIMBELMAN & SMITH, 1966). Apesar da alteração na via de administração, ainda eram necessárias administrações diárias e a baixa fertilidade persistia. Os problemas de fertilidade subsequente aos tratamentos com

progesterona, aparentemente ocorriam devido ao desenvolvimento de folículos persistentes e da reduzida competência ovocitária (ANDERSON & DAY, 1994; MIHM et al., 1994).

No início dos anos 70 surgiram os primeiros dispositivos auriculares liberadores de progesterona (Norgestomet) (WILTBANK et al., 1971), evitando a necessidade de sua administração diária. Entretanto, somente com a descoberta da prostaglandina como fator uterino luteolítico (DOUGLAS & GINTHER, 1973; MCCracken et al., 1972), é que houve considerável aumento nas taxas de concepção, quando uma injeção de prostaglandina foi associada aos protocolos com progestágeno. Com a melhora na habilidade do controle do desenvolvimento folicular ovariano, a duração dos tratamentos progestágenos nos protocolos de sincronização tem sido progressivamente reduzida. Estudos realizados na década de 90, demonstraram que a administração de estradiol em associação com os progestágenos sincronizaram o desenvolvimento folicular, o que permitiu que o tempo dos tratamentos de progestágenos fossem reduzidos (~1 semana) e que fertilidade aceitável para IATF fosse alcançada (BO et al., 1995).

3.1.2. Vantagens

Uma importante vantagem do controle exógeno do ciclo estral é o fato de permitir que as fêmeas sejam inseminadas em momento pré-determinado, excluindo-se, assim, a necessidade de detecção de cio, que é uma das principais limitações da inseminação artificial convencional, pois grande parte dos cios não são visualizados. Essa falha ocorre pelo fato de muitas vacas manifestarem cio no período da noite, e outras apresentarem cio silencioso. Dessa forma, sabe-se que cerca de 30% dos animais não são detectados em cio, representando uma queda na percentagem de fêmeas inseminadas. De acordo com Baruselli et al. (2004a), em *Bos indicus*, as taxas de detecção de estro são ainda menores do que em *Bos taurus*, por apresentarem uma maior expressão de cios noturnos e por serem de curta duração. Em bubalinos, a inseminação só é viabilizada com a previa sincronização das ovulações, visto que o subestro ou estro silencioso é o principal fator associado a baixa eficiência reprodutiva nesta espécie (KANAI & SHIMIZU, 1983; PRAKASH 2002; MADAN & PRAKASH 2007), especialmente durante os períodos quentes, ou em regiões em que é quente o ano todo, como norte brasileiro.

Além disso, a sincronização de ovulação para IATF possibilita que uma parcela significativa do rebanho se torne gestante logo após o período voluntário de espera, reduzindo o período de serviço e o intervalo entre partos, pois as fêmeas podem ser induzidas ao cio a

partir do 40º dia pós-parto (DPP). Dentre as vantagens de inseminar as vacas em tempo-fixado inclui-se, ainda, o fato de encurtar a estação de monta da propriedade, além de produzir bezerros mais uniformes, permitindo que se programe o nascimento dos animais para um período de melhores condições climáticas e de pastagem, por exemplo.

Dessa forma, várias associações hormonais utilizadas para controlar o ciclo estral vêm sendo estudadas e utilizadas na tentativa de maximizar o potencial reprodutivo e produtivo dos rebanhos; sendo que o sucesso desses protocolos, assim como o seu impacto econômico já foram bem descritos (BARUSELLI et al., 2004b; BO et al., 1994, 1995, 2003).

3.1.3. Limitações

Apesar das vantagens da sincronização de ovulação e IATF, existem algumas limitações, tais como a necessidade de haver um técnico especializado para estabelecer o melhor protocolo para cada categoria animal. Além disso, deve-se selecionar os animais que poderão entrar no programa, de acordo com a condição corporal de cada vaca e as condições reprodutivas de vacas e novilhas. Este fator requer muita atenção, pois sabe-se que o estado corporal do animal está diretamente relacionado à fertilidade (GOTTSCHELL, 2002). De acordo com Humblot et al. (1996), os animais devem apresentar um escore de condição corporal mínimo de 2,5 para que se atinja resultados satisfatórios na prenhez.

Para isso, o ideal é que se faça uma avaliação das condições gerais de cada candidata à entrar no programa de sincronização de ovulação e IATF, e uma avaliação das condições uterinas e ovarianas, através de exame ultrassonográfico, no intuito de detectar se a fêmea está em atividade estral, bem como detectar possíveis infecções uterinas, cistos ovarianos ou outras alterações (DESCÔTEAUX et al., 2010) que impossibilitem o sucesso da técnica.

3.2. INDUTORES DE OVULAÇÃO

Nos protocolos de sincronização de ovulação atualmente utilizados, são feitas associações hormonais entre uma fonte de progesterona associada a um indutor de ovulação no início do protocolo para induzir uma nova onda folicular, uma dose luteolítica de Prostaglandina e um indutor de ovulação no final do protocolo, no intuito de permitir que as ovulações ocorram no menor intervalo de tempo possível. Um indutor de ovulação ideal é aquele que induz, dentro de um intervalo máximo de 24 horas, todas as ovulações, para que ocorram no momento mais aproximado ao momento da inseminação. Da mesma forma, deve-

se programar as inseminações, de acordo com o indutor utilizado, já que o mecanismo de ação varia de acordo com o hormônio aplicado. Neste sentido, os indutores de ovulação atualmente utilizados no Brasil para sincronização de ovulação e IATF são os análogos de GnRH (ex. buserelina, lecirelina) e o estradiol 17 β e os ésteres de estradiol (Benzoato, Valerato e Cipionato de estradiol).

O GnRH é o principal indutor de ovulação utilizado nos protocolos aplicados nos EUA, Canadá e nos países da Europa, onde o uso de estrógenos é proibido. Este hormônio age diretamente na hipófise, estimulando a liberação de LH. Dessa forma, a ovulação induzida pelo GnRH ocorre mais rapidamente do que ocorre com o estradiol e seus ésteres. De acordo com Pursley et al. (1995), em um protocolo baseado no uso de GnRH-PGF-GnRH, a ovulação ocorre cerca de 24 a 32 horas após aplicação exógena da segunda dose do GnRH. Em búfalas, se preconiza somente o uso de GnRH para induzir a ovulação, pois esta espécie parece não responder ao estradiol exógeno

Os ésteres de estradiol são os indutores de ovulação mais utilizados nos rebanhos brasileiros, devido ao seu baixo custo em relação ao GnRH. O mecanismo de ação ocorre a nível hipotalâmico, estimulando a maior liberação de GnRH e, assim, estimular a secreção hipofisária de LH; portanto, a ovulação ocorre mais tarde do que ocorre na administração de GnRH. Os estrógenos se diferem, principalmente, pelo tempo de meia-vida de cada um, sendo o benzoato de estradiol (BE) o éster com meia-vida mais curta (~ 3 dias), o valerato de estradiol (VE) e o cipionato de estradiol (ECP) apresentam meia-vida intermediária (~ 7-8 dias) e longa (~ 10-12 dias), respectivamente. O valerato de estradiol não é convencionalmente utilizado de forma isolada, para induzir a ovulação; somente em produtos comerciais que associam este estrógeno com um progestágeno, como no caso no implante auricular Crestar[®] (Norgestomet + VE). A ovulação induzida pelo BE administrado 24 após a remoção da fonte de progesterona ocorre cerca de 69 h após a indução (MARQUES et al., 2003; PFEIFER et al., 2014). Já quando se utiliza o ECP, a ovulação ocorre cerca de 55h após a aplicação do estrógeno (PANCARCI et al., 2002).

De acordo com Stevenson et al. (2004), com o uso do GnRH para induzir a ovulação, a taxa de cio é baixa, pois o pico de estrogênio secretado pelo folículo pré-ovulatório é prematuramente suprimido pelo pico de LH. Em um estudo foi relatado que a taxa de cio foi de 20% após a injeção de GnRH para induzir a ovulação (STENVENSON et al., 1996). Dessa forma, o uso de GnRH é um fator limitante em protocolos que utilizam observação de cio para inseminação. Por outro lado, O GnRH é mais efetivo em causar o pico pré-ovulatório de LH e, consequentemente, a ovulação do que o estradiol (STEVENSON et al., 2004).

Os ésteres de estradiol, induzem fortemente as manifestações de cio. Essa característica, considerada uma vantagem para alguns, é observada principalmente quando se utiliza o ECP como estímulo ovulatório; entretanto, muitas vezes, o cio observado não se seguiu de ovulação, sendo caracterizado como “falso cio”, o que se torna uma desvantagem, pois induz ao desperdício de sêmen. Além disso, devido ao seu poder residual em produtos cárneos e lácteos, o uso de estradiol e seus ésteres em produção animal é proibido em alguns países (COMUNIDADE EUROPEIA, 2008).

3.3. ASSOCIAÇÃO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL E PROGESTERONA

Grande parte dos protocolos incluem a associação de uma fonte de progesterona ao benzoato de estradiol (BE) para sincronizar as ovulações tanto em vacas de corte quanto em vacas de leite (MACMILLAN & PETERSON, 1993, MACMILLAN et al., 1996; BURKE et al., 1996; BÓ et al., 2002). No início do tratamento (Dia 0 do protocolo) esta associação é feita para induzir a emergência de uma nova onda folicular. Após a retirada da fonte de progesterona (Dia 8 ou 9), é administrado um análogo de prostaglandina para induzir a regressão do corpo lúteo (CL) e por fim se utiliza o ECP ou BE para induzir a ovulação. A preferência pelos ésteres ocorre devido à redução no custo do protocolo quando comparado ao GnRH, sem que haja redução nos índices reprodutivos. Além disso, o estradiol administrado em associação com a progesterona exógena no início do protocolo resulta em melhor sincronia na emergência folicular. Dessa forma, os programas de sincronização de estro utilizados no Brasil normalmente utilizam os ésteres de estradiol no início e no final do protocolo, por seus benefícios e por não haver restrições quanto ao uso do estradiol para fins de reprodução animal.

De acordo com Bridges et al. (1999), os ésteres de estradiol aplicados no início do tratamento com progestágenos promovem boa taxa de sincronização de estro. O tratamento com estradiol-17 β associado aos progestágenos, atualmente utilizados principalmente na forma de dispositivos intravaginais, é capaz de provocar regressão folicular, resultando na emergência de uma nova onda folicular, em média, 4,3 dias após o tratamento (BO et al., 1994). Além disso, o estradiol empregado no final do tratamento, para sincronizar a ovulação, promove um *feedback* positivo sobre as concentrações de LH logo após a remoção da fonte de progesterona exógena, o que induz o pico pré-ovulatório de LH.

Para induzir a ovulação, recomenda-se que o BE seja administrado 24 horas após a remoção do implante liberador de progestágeno (BÓ et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002,

2005; BARUSELLI et al., 2004c). Entretanto, outros estudos demonstraram a possibilidade de aplicar o ECP no momento da retirada do implante de progestágeno, no intuito de reduzir o manejo, resultando em taxas de prenhez semelhantes ao uso do BE (MARQUES et al., 2004; PENTEADO et al., 2005; AYRES et al., 2006).

De acordo com Moraes et al. (2002), o estrógeno pode estimular ou inibir a liberação de gonadotrofinas, dependendo da dose e das concentrações sanguíneas de progesterona. Em doses fisiológicas e baixas concentrações de progesterona, o estrógeno estimula a liberação de LH para que ocorra a ovulação. Ao contrário, elevadas doses de estradiol, na presença de elevadas concentrações de progesterona, bloqueiam as gonadotrofinas.

3.4. PROTOCOLOS A BASE DE GNRH

O primeiro protocolo que possibilitou o uso da IATF com satisfatória taxa de prenhez (~50%) foi o *Ovsynch* (THATCHER et al., 1989; PURSLEY et al., 1995), desenvolvido na década de 90. Esse protocolo consiste na aplicação de uma injeção de GnRH seguido de uma dose de PGF 7 dias depois, e finalmente, outra dose de GnRH 48h após a PGF, seguido de IATF 16-18 horas após a segunda dose de GnRH (Figura 1). O princípio desse protocolo consiste em provocar a ovulação e formação de um corpo lúteo ou luteinização do folículo dominante, para posterior luteólise com a aplicação de PGF. A segunda aplicação de GnRH tem a finalidade de desencadear o processo ovulatório e, com isso, a ovulação sincronizada (MORAES et al., 2002). De acordo com Pursley et al. (1995), a administração da segunda injeção de GnRH proporciona a ovulação sincronizada dentro de um período de 8 h (de 24 a 32 horas após o segundo GnRH) em todas as vacas em lactação e novilhas nas quais houve regressão do corpo lúteo em resposta à PGF. Entretanto, nos animais que não receberam a segunda dose de GnRH as ovulações ocorrem em um período de 36 h (84-120 h após PGF) (PURSLEY et al., 1995), demonstrando a necessidade de se utilizar um indutor de ovulação ao final do protocolo para melhor sincronizar o momento das ovulações. Inicialmente, não se utilizava nenhuma fonte de progesterona no protocolo *Ovsynch*; sendo assim, a associação de um implante contendo progestágeno ao GnRH aplicado no Dia 0 foi uma importante modificação feita neste protocolo, aumentando significativamente as taxas de fertilidade (AMBROSE et al., 2005).

O protocolo *Co-Synch* é uma modificação do *Ovsynch*, em que a segunda dose de GnRH é administrada no momento da IATF, 48 a 64 horas após o tratamento com PGF. O *Co-Synch*, associado a uma fonte de progesterona, é o protocolo mais utilizado nos EUA, e

resulta em taxas de gestação que variam de 30 a 65% (KASIMANICKAM et al., 2006; BRIDGES et al., 2010). Outro protocolo desenvolvido a partir do *Ovsynch* foi o *Heatsynch*, em que ocorre a substituição da segunda dose de GnRH por cipionato de estradiol (PANCARCI et al., 2002; STEVENSON et al., 2004). Esse protocolo representou uma alternativa importante pelo fato de reduzir custo com manejo reprodutivo (uma dose de GnRH é cerca de 8 vezes mais cara do que uma dose de ECP) e induzir as manifestações do estro, como secreção mucovaginal e comportamento característico do cio quando administrado 24 horas após a remoção do implante de progesterona (STEVENSON et al., 2004). Entretanto, este protocolo não é utilizado em países em que o uso do estradiol é proibido, como nos Estados Unidos e países da Comunidade Europeia.

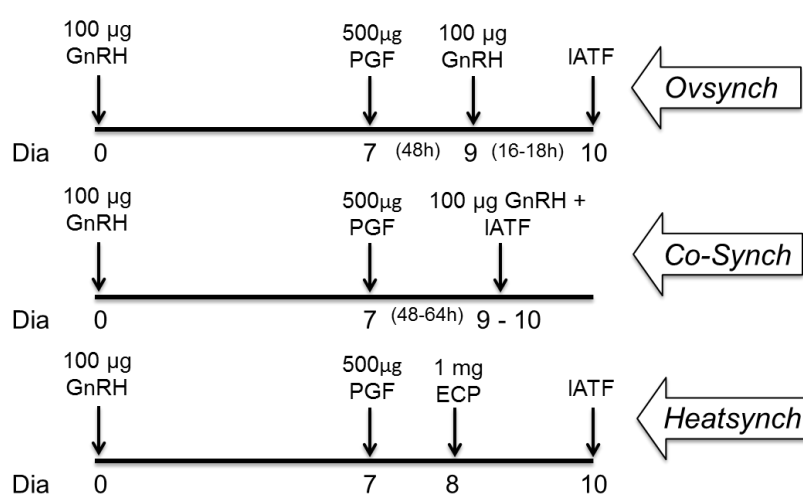


Figura 1. Desenho ilustrativo dos protocolos hormonais de sincronização de cio e IATF *Ovsynch*, *Co-Synch* e *Heatsynch* utilizados em bovinos.

Existem, ainda, outras modificações feitas ao protocolo *Ovsynch*, como o *Select-Synch* (GEARY et al., 2000; DeJARNETTE et al., 2001), adaptado para vacas com cria ao pé, em que se insemina somente as que apresentarem cio após a segunda dose de GnRH. No protocolo *Pre-synch*, se faz uma “pré-sincronização” com PGF, em duas aplicações com 11-14 dias de intervalo e depois o protocolo é igual ao *Ovsynch*. Essas aplicações de PGF são feitas no intuito de aumentar a resposta folicular à primeira dose de GnRH e, assim, aumentar a taxa de prenhez (MORERIA et al., 2000; EL-ZARKOUNY et al., 2004). Este protocolo é indicado para vacas em pós-parto recente, pois favorece a reabsorção uterina.

3.5. LIMITAÇÕES DO USO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL EM PRODUÇÃO ANIMAL

Como mencionado anteriormente, os programas de sincronização de ovulação utilizados no Brasil, bem como em diversos outros países, optam por administrar ésteres de estradiol, tanto no início, como no final do protocolo, por seu baixo custo e alta eficiência. Entretanto, apesar dos seus benefícios, o uso destes estrógenos, bem como de outros hormônios usados em produção animal, tem sido amplamente discutido, principalmente no que se refere a seguridade para humanos que ingerem derivados de animais tratados com esses produtos.

Desde 1996, o conselho diretivo 96/22/EC da União Européia proíbe a administração de substâncias que tenham efeitos tireostáticos, estrogênicos, androgênicos ou gestagênicos e de Beta-agonistas na criação animal (COMUNIDADE EUROPEIA, 1996), enquanto que algumas aplicações terapêuticas destas drogas ainda são permitidas. Particularmente o estradiol-17 β , usado com o objetivo de promover crescimento animal e de controlar o ciclo estral, foi considerado como um agente carcinogênico completo pelo Comitê científico no Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH), pois exerce efeitos como agente iniciador e como promotor de crescimento tumoral, sendo relacionado particularmente ao câncer de mama em humanos. Apesar de os dados atualmente disponíveis não permitirem a obtenção de uma estimativa quantitativa do risco, desde 2008, o Parlamento Europeu banuiu o estradiol e seus ésteres, incluindo aqueles com fins terapêuticos, para assegurar a proteção da saúde humana dentro da comunidade europeia.

Apesar de existirem diversos relatos que associam distúrbios hormonais ao uso de hormônios esteroides na reprodução animal, não existem estudos epidemiológicos adequados para averiguar se o consumo de alimentos com resíduos de ésteres de estradiol está envolvido no risco desenvolvimento destes distúrbios. Além disso, é difícil determinar a quantidade de resíduos dos ésteres de estradiol que permanecem na carne e no leite oriundos de animais tratados. A literatura disponível leva-nos a crer que se o tratamento e o período de carência forem seguidos corretamente, o nível destes hormônios no leite e na carne em animais tratados, talvez sejam levemente maiores do que animais não tratados. Entretanto, a concentração destes hormônios ainda estaria dentro das variações fisiológicas que os animais naturalmente estão expostos durante o ciclo estral. De qualquer forma, a proibição quanto ao uso de ésteres de estradiol, embora ainda não tenha sido efetuada em diversos países, como o Brasil, não há garantias de que essas resoluções internacionais não afetem o Brasil, pois,

atualmente, o país ocupa uma posição estratégica e essencial na produção de alimentos para o mundo.

Neste âmbito, nossos produtores e sistemas de produção podem estar à mercê de embargos nas exportações e de acordos comerciais internacionais. Dessa forma, especial atenção deve ser dada aos períodos de carência destes fármacos, pois não há nem mesmo consistência no tempo de descarte do leite e da carne de um mesmo princípio ativo entre diferentes fabricantes. Em uma simples busca nos compêndios veterinários e nas próprias bulas dos ésteres de estradiol disponíveis no mercado brasileiro, os períodos de carência são altamente heterogêneos (Tabela 1). Entretanto, geralmente o período de descarte para animais tratados com benzoato de estradiol é de 30 dias para o leite e para o abate. Já para o cipionato de estradiol, alguns laboratórios indicam que o período de carência é 0 (zero) tanto para o leite quanto para o abate e outros que não indicam seu uso para animais de produção leiteira. De qualquer forma, alternativas para o uso de ésteres de estradiol para o controle da onda folicular e ovulação podem representar redução das perdas com o descarte do leite e a produção de produtos mais saudáveis e seguros para o consumo humano.

Tabela 1. Indicação do período de carência informado na bula de produtos comerciais feitos à base de análogos de 17- β Estradiol.

Nome Comercial	Tipo de éster de estradiol	Período de Carência	
		Abate	Leite
Gonadiol [®]	Benzoato de estradiol	60 dias	Não utilizar
Bioestrogen [®]	Benzoato de estradiol	10 dias	30 dias
Cronibest [®]	Benzoato de estradiol	10 dias	30 horas
Ric-BE [®]	Benzoato de estradiol	Não informa	Não informa
E.C.P. [®]	Cipionato de estradiol	zero	Não utilizar

Dessa forma, o Brasil, sendo o maior exportador de carne bovina do mundo e o sexto maior produtor de leite, deve estar conectado com as exigências mercadológicas do comércio mundial de leite, carne e seus derivados, principalmente no que diz respeito aos mercados nobres, que podem pagar melhor pelo produto. Desta forma, é necessário encontrar alternativas para que além de atender as exigências do mercado externo, o Brasil ainda continue produzindo proteína animal com alta competitividade e qualidade, sem que seja necessário elevar consideravelmente os custos com protocolos reprodutivos, uma vez que para se utilizar as duas doses de GnRH necessárias em um protocolo que não utiliza estradiol, o

custo é aproximadamente 8 vezes maior do que duas doses de estradiol. Por essa razão, somada à questão residual e as proibições quanto ao uso do estradiol, se torna interessante a elaboração de uma alternativa para viabilizar o uso da IATF que produza resultados satisfatórios, sem a elevação excessiva nos custos.

3.6. A DUPLA FUNÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas endógenas fazem parte de um grupo de compostos denominados eicosanóides, derivados do ácido aracdônico, que são produzidos em praticamente todos os tecidos animais, exercendo diversas funções (WEEMS et al., 2006; FERNANDES & FIGUEIREDO, 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). A ação mais associada às prostaglandinas é a indução de contrações ou relaxamento das células musculares lisas em diversos órgãos (FERNANDES & FIGUEIREDO, 2007), sendo que a propriedade terapêutica mais utilizada em medicina veterinária é a capacidade de algumas prostaglandinas da série F provocarem a luteólise (TSAI & WILTBANK, 1997), causando a regressão morfológica e funcional do CL (KOTWICA et al., 2002). Assim, na década de 70 vários compostos análogos à Prostaglandina F₂ α natural foram sintetizados, como o Cloprostenol (COOPER & FURR, 1974). Mais tarde descobriu-se que o corpo lúteo só é responsivo à ação da PGF entre os dias 5º e 17º dia do ciclo estral, a partir daí se inicia a regressão luteal espontânea pela ação da PGF endógena (ODDE, 1990; LARSON, 1992). Essa descoberta resultou em melhores taxas de ovulação, pois somente após a regressão luteal, o folículo dominante presente no ovário adquire capacidade ovulatória (KASTELIC et al., 1990).

A aplicação da PGF possibilita maiores taxas de estro e de IA em comparação com sistemas que utilizam apenas detecção do cio, entretanto, quando a PGF é administrada isoladamente, o estro não ocorre de forma sincronizada, podendo se manifestar durante um período de aproximadamente cinco dias. Assim, para a implantação de programas de IATF, administração isolada de PGF (uma ou duas doses) se torna ineficiente. Por essa razão, a maioria dos protocolos atualmente utilizados para a sincronização de cio e IATF utiliza análogos de PGF associados a outros fármacos, como uma fonte de progesterona exógena e indutores de ovulação, como os ésteres de estradiol, GnRH, eCG ou LH.

A ação luteolítica da PGF é conhecida desde a década de 70, e a partir desta descoberta, as taxas de fertilidade dos animais melhorou consideravelmente, mas além das funções anteriormente mencionadas, a PGF tem sido associada também à ovulação em diversas espécies (BRIDGES & FORTUNE, 2007; DAVIES et al., 2006; PEIFER et al., 2009, 2014;

NEGLIA et al., 2012; LEONARDI et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que a PGF está diretamente ligada à ovulação em novilhas e vacas, atuando por um mecanismo independente da luteólise (PFEIFER et al., 2009; 2014; LEONARDI et al., 2012). Entretanto, o mecanismo pelo qual a PGF atua ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que diversos estudos têm buscado compreender como ocorre a indução da ovulação pela PGF (MURDOCH et al., 1993; RANDEL et al., 1996; NAOR et al., 2007; FORTUNE et al., 2009).

A primeira sugestão foi de que a PGF poderia estar envolvida na liberação de GnRH (ZOR et al., 1970). Em seguida, diversos estudos relacionaram a administração exógena de PGF ao aumento na liberação de LH em ovelhas (CARLSON et al., 1973), camundongos (RATNER et al., 1974) e vacas pós-parto (RANDEL et al., 1988, 1996). Além disso, quando utilizada em protocolos de sincronização de ovulação, associada à utilização de progestágenos, a PGF pode potencializar os efeitos da progesterona exógena após a remoção do progestágeno (PFEIFER et al., 2009), aumentando, assim, a capacidade de resposta da hipófise ao GnRH (RANDEL et al., 1996) e induzindo a ovulação. Além disso, de acordo com Weems et al. (2006), a PGF exerce um efeito direto sobre a hipófise anterior para aumentar essa capacidade de resposta da hipófise, resultando, assim, na maior liberação de LH (RANDEL et al., 1996). Entretanto, os efeitos da PGF sobre a secreção de LH são controversos, pois embora a sua administração cause ovulação em vacas e ovelhas em anestro (CRUZ et al., 1997; DAVIES et al., 2006), a relação com o aumento na liberação de LH é citada apenas em vacas. Assim, diversos estudos indicam que a PGF pode atuar também localmente, no ovário, para induzir a ovulação. De acordo com Murdoch et al. (1993), a prostaglandina secretada pelo folículo pré-ovulatório está intimamente ligada com o processo ovulatório. Como se sabe, as prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$ são produzidas pelas células da granulosa (BRIDGES & FORTUNE, 2003), agindo diretamente no folículo dominante. Assim, pode-se considerar o fato de a PGF atuar de duas formas distintas, agindo sobre os receptores de GnRH presentes na hipófise e também de forma direta nas células do folículo pré-ovulatório. O fato é que a influência da PGF sobre a ovulação já foi comprovada, sendo que em um estudo recente foi demonstrado que a PGF possui efeito semelhante ao do ECP e BE na indução da ovulação de novilhas e vacas submetidas a protocolos de IATF baseados na associação de progesterona intravaginal e BE, resultando inclusive, em taxas de gestação de aproximadamente 50%, considerada uma porcentagem aceitável (PFEIFER et al., 2014).

4. ARTIGO 1

Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em vacas e búfalas leiteiras

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de um análogo de Prostaglandina F2 α (PGF) como indutor de ovulação em vacas e búfalas leiteiras em lactação. No Experimento 1, 16 búfalas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE), i.m., no Dia 0 e um implante intravaginal de progesterona (CIDR) que permaneceu até o Dia 9. Nos Dias 8 e 9, as fêmeas receberam 500 μ g de d-Cloprostenol (análogo de PGF), i.m.. No Dia 10, as búfalas foram separadas em dois grupos para receberem 500 μ g de PGF (Grupo PG, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8). Não houve diferença entre os grupos na taxa de ovulação (P = 0,30), sendo que a taxa geral foi de 68%. Também não houve diferença entre os grupos no momento da ovulação (P = 0,61), sendo que o momento de ovulação médio foi de 89 horas após a remoção do CIDR. No Experimento 2, foram utilizadas 16 vacas lactantes, mestiças Girolando. No Dia 0, as vacas receberam 2 mg de BE e um CIDR que permaneceu até o Dia 8. Nos Dias 7 e 8, foi administrado 500 μ g de d-Cloprostenol, im. No Dia 9, as vacas foram separadas em dois grupos para receberem 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8). Apenas uma vaca, pertencente ao Grupo PG, não ovulou. Não houve diferença no momento da ovulação (P = 0,69) entre os Grupos CTL e PG, sendo que, em média, a ovulação ocorreu em 82 horas após a remoção do CIDR. Além disso, 87% das vacas ovularam de forma sincronizada, no período de 72 a 84 h após a remoção do CIDR, sem diferença entre os Grupos (P = 0,9). No Experimento 3, foram sincronizadas 16 vacas mestiças Girolando em lactação que foram tratadas de forma semelhante ao Experimento 2, entretanto, as vacas não receberam injeção de d-Cloprostenol no Dia 8. Todas as vacas ovularam e não houve diferença no diâmetro do folículo ovulatório (P = 0,34) entre os grupos CTL e PG. Vacas tratadas com PG ovularam mais cedo em relação ao Grupo CTL ($62,5 \pm 5,8$ vs $94,5 \pm 13,5$ h; P = 0,05). Os resultados sugerem que a PGF antecipa a ovulação em vacas lactantes, entretanto, esse efeito não foi observado em búfalas lactantes.

Palavras-chave: Bovinos, bubalinos, controle estral, indutor ovulatório.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficiency of a Prostaglandin F2 α analogue (PGF) as ovulatory stimulus in dairy cows and buffaloes. In Experiment 1, 16 lactating dairy buffaloes received a 2 mg estradiol benzoate (EB) im, on Day 0. A progesterone-releasing device (CIDR) was intravaginally placed from Day 0 to Day 9. On Days 8 and 9 cows were given 500 μ g of d-Cloprostenol (PGF analogue), im. On Day 10, buffaloes were assigned into two groups to receive 500 μ g of PGF (PGF Group, n = 8) or no treatment (CTL Group, n = 8). There was no difference in ovulation rate (P = 0.30), on average 68%. Moreover, there was no difference between Groups in time of ovulation (P = 0.61), on average 89 h after the CIDR removal. In Experiment 2, 16 lactating dairy cows (Girolando crossbred), cows received 2 mg EB on Day 0. A CIDR was intravaginally placed from Day 0 to Day 8. On Days 7 and 8, cows were given 500 μ g of d-Cloprostenol. On Day 9, the cows were assigned into two groups to receive a 500 μ g of d-Cloprostenol (PGF Group, n = 8) or no treatment (CTL Group, n = 8). Only one cow from PG Group did not ovulate. There were no differences in the time of ovulation between CTL and PG Groups (P = 0.69), whereas, on average, ovulation occurred 82 h after CIDR removal. In addition, 87% of cows ovulated in a synchronized manner, within 72 and 84 h after CIDR removal. In Experiment 3, 16 lactating cows (Girolando crossbred) that were handled and treated similarly to the Experiment 2, however, the cows did not receive d-Cloprostenol on Day 8. All cows ovulated and there was no difference in the diameter of the ovulatory follicle (P = 0.34) between PGF and CTL Groups. Cows treated with PGF ovulated earlier than CTL Group (62.5 ± 5.8 vs 94.5 ± 13.5 h; P = 0.05). These results suggested that PGF hasten ovulation in lactating dairy cows, however its effect was not observed in dairy buffaloes.

Key-words: Cattle, Buffaloes, Control of Estrous Cycle, Ovulatory Stimulus.

Introdução

A sincronização da ovulação para viabilizar a Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF) é uma importante tecnologia implementada para aumentar a lucratividade de fazendas comerciais de bovinos e bubalinos, resultando no aumento na taxa de serviço, além de possibilitar que um grande número de fêmeas estejam gestantes logo no início da estação reprodutiva (BARUSELLI et al., 2002). Além disso, a IATF elimina a necessidade de observação de cio, que representa uma das principais limitações para o sucesso da

inseminação artificial, especialmente em bubalinos, em que a alta incidência de subestro ou cio silencioso talvez seja o principal fator ligado a baixa eficiência reprodutiva (KANAI & SHIMIZU 1983; PRAKASH, 2002; MADAN & PRAKASH, 2007). Em bubalinos, a concentração de estradiol-17 β no sangue durante a fase folicular do ciclo estral parece ser relativamente menor do que em bovinos (AVENELL et al., 1985; KANAI et al., 1990; ROY & PRAKASH, 2009), sendo essa uma possível razão para a menor intensidade das manifestações de estro em búfalas (PERERA, 2011). Assim, a inseminação artificial após observação de cio se torna inviável nesta espécie.

Uma grande variedade de protocolos de sincronização de ovulação comprovadamente eficientes para bovinos e que vem sendo adaptados para aplicação também em bubalinos (BARUSELLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001; CAMELO, 2002; BARUSELLI & CARVALHO, 2005; ROLIM FILHO et al., 2009) tem sido utilizada no Brasil. Grande parte dos protocolos incluem o uso de uma fonte exógena de progesterona, associada ao benzoato de estradiol (BE) no início do tratamento para induzir a emergência de uma nova onda folicular, um análogo de prostaglandina para induzir a regressão do corpo lúteo (CL) e um indutor de ovulação, como o GnRH, cipionato de estradiol (ECP) ou BE. Búfalas parecem não responderem adequadamente ao estradiol exógeno, portanto, nesta espécie se preconiza o uso GnRH como estímulo ovulatório.

Embora os análogos de PGF sejam amplamente utilizados como agentes luteolíticos, a secreção intrafolicular das prostaglandinas está intimamente relacionada com o período periovulatório (SILVA & REEVES, 1985; ALGIRE et al., 1992; BRIDGES & FORTUNE, 2007). Além disso, estudos já demonstraram que a aplicação exógena de d-Cloprostenol (análogo de PGF) induz a primeira ovulação em novilhas de corte (PFEIFER et al., 2009; LEONARDI et al., 2012), sendo mais recentemente demonstrado que a PGF antecipa a ovulação em novilhas púberes e em vacas lactantes submetidas a sincronização de ovulação sem prejudicar a fertilidade dos protocolos de IATF (PFEIFER et al., 2014). Apesar dessas comprovações, ainda não se tem estudos demonstrando o efeito da PGF na ovulação de bubalinos.

Com base nas considerações apresentadas, a hipótese deste estudo foi que a administração de um análogo de PGF 24 horas após a remoção da fonte de progesterona exógena seria capaz de induzir a ovulação de forma sincronizada em vacas e búfalas leiteiras. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do d-Cloprostenol como indutor de ovulação em vacas e búfalas leiteiras.

Material e Métodos

O estudo foi realizado entre outubro de 2013 e fevereiro de 2014 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa – Rondônia, sob o código F.02/2014.

Experimento 1

Este experimento foi conduzido no campo experimental do Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia (Embrapa – Rondônia), situado no município de Presidente Médici, RO, Brasil (11°10'33"S, 61°54'03"O). Para o estudo, foram utilizadas 16 búfalas leiteiras mestiças (principalmente Murrah) em lactação, com idade entre 4 e 13 anos, mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*, com livre acesso à água e sal mineral. As vacas foram ordenhadas uma vez ao dia com bezerro ao pé.

O desenho experimental deste experimento está demonstrado na figura 1A. No Dia 0, as búfalas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba) i.m. e um implante intravaginal de progesterona (CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, São Paulo) que permaneceu até o Dia 9. Nos Dias 8 e 9 as fêmeas receberam 500µg de d-Cloprostenol (análogo de PGF, Croniben[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba) i.m.. No Dia 10, as búfalas foram separadas em dois grupos homogêneos quanto ao diâmetro do Folículo Dominante (FD) para receberem 500µg de PGF (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8).

Experimento 2

Este estudo foi conduzido no campo experimental da Embrapa – Rondônia, situado no município de Porto Velho, RO, Brasil (08°48'12" S, 63°50'56" O). Dezesesseis vacas Girolando (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) em lactação foram utilizadas no experimento. As vacas eram mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv *Marandu*, sendo suplementadas com farelo de milho e soja após cada ordenha (2 vezes ao dia). Os animais tinham livre acesso à água e sal mineral.

O desenho experimental está ilustrado na figura 1B. No Dia 0, todas as vacas receberam 2 mg, i.m., de BE e um implante intravaginal de progesterona que permaneceu até o Dia 8. Nos Dias 7 e 8, foi administrado 500µg de d-Cloprostenol, im. No Dia 9, as vacas foram separadas em dois grupos homogêneos quanto ao diâmetro do FD para receberem 500µg de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8).

Experimento 3

Neste estudo foram sincronizadas 16 vacas Girolando (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) em lactação. Os animais foram tratados de forma similar aos do Experimento 2. O desenho experimental está ilustrado na figura 1C. As vacas foram sincronizadas e separadas em Grupos de forma semelhante ao Experimento 2, entretanto, todas vacas receberam uma injeção luteolítica de d-Cloprostenol apenas no Dia 7. No Dia 9, as vacas foram separadas em dois grupos homogêneos quanto ao diâmetro do FD para receberem 500µg de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8).

Avaliações Ultrassonográficas e Definições

Para determinar a atividade estral, as fêmeas foram examinadas por ultrassonografia transretal (SIUI CTS-900, probe linear com 5 MHZ, Guangdong, China) previamente ao início de cada experimento. Somente vacas que apresentavam um corpo lúteo (CL) e/ou um folículo dominante (FD) foram consideradas com atividade estral e incluídas no estudo. Durante os experimentos, o exame foi realizado para detectar a presença e diâmetro de todos os folículos maiores ou iguais a 3 mm de diâmetro e do CL, bem como para avaliar a presença de líquido uterino. Nos experimentos 1 e 2, os exames ultrassonográficos foram realizados a cada 12 horas a partir do dia da retirada do CIDR até a detecção da ovulação ou até seis dias após a remoção do implante intravaginal.

Com o objetivo de realizar a normalização dos dados de crescimento folicular (GARCIA & SALAHEDDINE, 2001), no Experimento 3, as vacas foram monitoradas diariamente do Dia 0 ao 8 e a cada exame era registrado o diâmetro e localização no ovário de todos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1989). A partir do Dia 8, o monitoramento ultrassonográfico foi realizado a cada 12 horas, assim como nos Experimentos 1 e 2. Os exames diários foram feitos a fim de monitorar o desenvolvimento da onda folicular de cada animal e o dia da emergência da onda folicular foi definida como retrospectivamente como o dia em que o folículo dominante foi identificado pela primeira vez, com um diâmetro de 4 a 5 mm (GINTHER et al., 1989; KNOPF et al., 1989). Em todos os experimentos, a ovulação foi determinada pelo desaparecimento de um folículo maior ou igual a 8 mm de diâmetro (MARTINEZ et al., 2005). A sincronia das ovulações foi determinada pela porcentagem de fêmeas que ovularam dentro de um intervalo de 24 horas. Nas búfalas do Experimento 1, foi definido que o intervalo seria entre 78 e 102 horas após a remoção do

implante de progesterona e nas vacas dos Experimentos 2 e 3, a ovulação sincronizada foi definida como as ovulações que ocorreram entre 60 e 84 horas após a remoção do implante.

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS (1998). Os dados referentes a variáveis contínuas (diâmetro do folículo pré-ovulatório e momento da ovulação) foram avaliados por Análise de variância – Fatorial ANOVA, sendo as médias comparadas entre os grupos através do teste de Tukey. Já os dados de variáveis categóricas (taxas de ovulação, de ovulação sincronizada e de prenhez) foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. A taxa de ovulação sincronizada foi calculada pelo número de vacas que ovularam dentro de uma janela de 24h sobre o total de ovulações. Os valores foram considerados significativos quando a probabilidade (valor de P) foi menor ou igual a 0,05. Quando o valor de P obtido foi entre 0,06 e 0,1, considerou-se uma tendência.

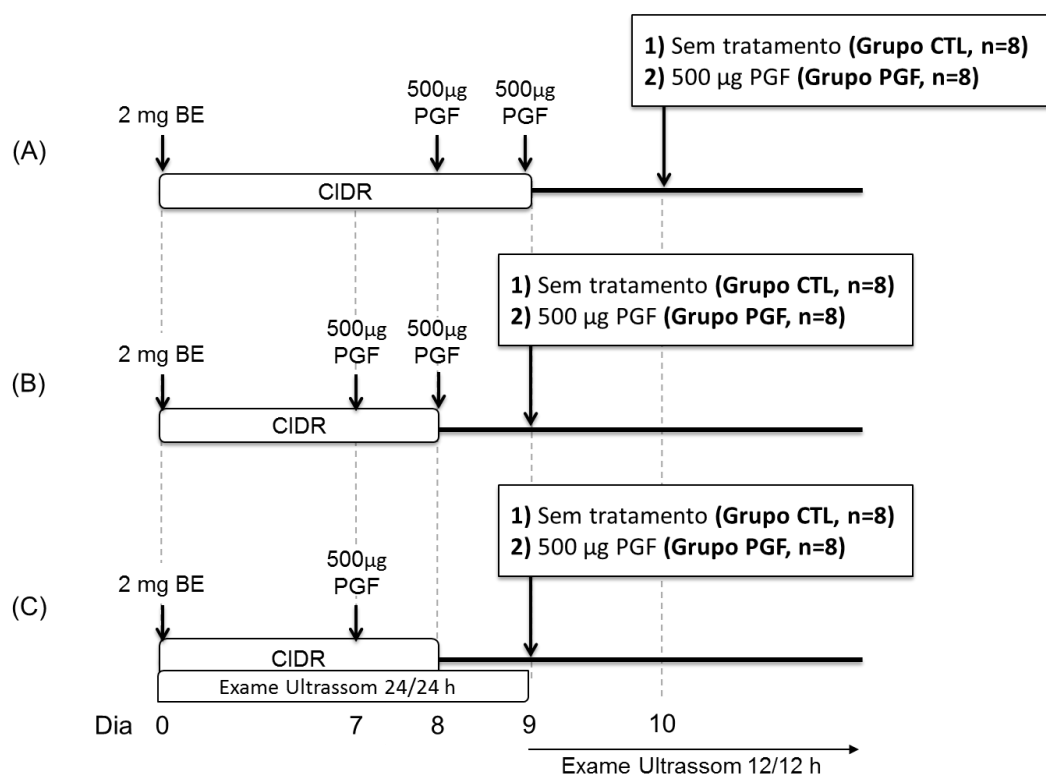


Figura 1. Desenhos experimentais utilizados nas (A) búfalas do Experimento 1 (n=16), (B) vacas do Experimento 2 (n=16) e (C) vacas do Experimento 3 (n = 16).

Resultados

Experimento 1

Os resultados referentes às respostas ovarianas estão descritos na tabela 1. Não houve diferença quanto a taxa de ovulação ($P = 0,30$), em que a taxa geral foi de 68%. O momento da ovulação também não diferiu entre os Grupos ($P = 0,61$), sendo que ocorreu, em média 89 horas após a remoção do CIDR. O diâmetro médio do folículo ovulatório foi de $15,7 \pm 0,9$ mm, sem diferença entre os Grupo PG e CTL ($P = 0,47$). A distribuição das ovulações está demonstrada na figura 2A.

Experimento 2

Os resultados de resposta ovariana estão descritos na tabela 1. Apenas uma vaca, que pertencia ao Grupo PGF, não ovulou durante o experimento. Não houve diferenças quanto ao diâmetro do folículo ovulatório ($P = 0,79$), que foi em média $13,9 \pm 0,6$ mm. O momento da ovulação ($P = 0,69$) e taxa de ovulação sincronizada ($P = 0,9$) também não diferiram entre os Grupos CTL e PGF. A distribuição das ovulações está demonstrada na figura 2B.

Experimento 3

Os resultados das respostas ovarianas estão demonstrados na tabela 1. Todas as vacas ovularam e não houve diferença no diâmetro do folículo ovulatório ($P = 0,34$) entre os grupos CTL e PGF, respectivamente. As vacas tratadas com PGF ovularam antecipadamente em relação ao Grupo CTL ($P = 0,05$). Houve uma tendência de maior sincronia de ovulações nas vacas tratadas com PGF, em que 75% das ovulações ocorreram de forma sincronizada (entre 60 e 84h após a remoção do CIDR), enquanto que apenas 37,5% das vacas que ovularam do grupo CTL ovularam nesse mesmo intervalo ($P = 0,1$).

Tabela 1. Percentagem de búfalas (Experimento 1) e vacas (Experimento 2 e Experimento 3) que ovularam durante os tratamentos, taxa de ovulação sincronizada, média (\pm Erro Padrão) do momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e do diâmetro do folículo ovulatório nas fêmeas que receberam tratamento com PGF (Grupo PGF) ou nenhum tratamento (Grupo CTL) 24 horas após a remoção do implante intravaginal de progesterona.

Respostas ovarianas	Grupo Experimental		
	CTL	PGF	Valor de P
Experimento 1 – Búfalas (PGD8D9D10)			
Taxa de ovulação	75% (6/8)	62,5% (5/8)	0,59
Taxa de ovulação sincronizada (78-102 h após a remoção do CIDR)	50% (3/6)	80% (4/5)	0,30
Momento da ovulação (h \pm EP)	92,0 \pm 8,6	85,2 \pm 9,5	0,61
Diâmetro do folículo ovulatório (mm \pm EP)	16,25 \pm 0,8	15,3 \pm 0,9	0,47
Experimento 2 – Vacas (PGD7D8D9)			
Taxa de ovulação	100% (8/8)	87,5% (7/8)	0,30
Taxa de ovulação sincronizada (60-84 h após a remoção do CIDR)	87,5% (7/8)	85,7% (6/7)	0,9
Momento da ovulação (h \pm EP)	84,0 \pm 5,7	80,0 \pm 6,1	0,69
Diâmetro do folículo ovulatório (mm \pm EP)	14,1 \pm 0,5	13,9 \pm 0,6	0,80
Experimento 3 – Vacas (PGD7D9)			
Taxa de ovulação	100% (8/8)	100% (8/8)	1
Taxa de ovulação sincronizada (60-84 h após a remoção do CIDR)	37,5% (3/8)	75% (5/7)	0,1
Momento da ovulação (h \pm EP)	94,5 \pm 10,4	62,5 \pm 10,4	0,05
Diâmetro do folículo ovulatório (mm \pm EP)	14,9 \pm 0,76	16,0 \pm 0,76	0,34

Discussão

A hipótese de que o d-Cloprostenol (análogo de PGF) administrado 24 horas após a remoção do implante de progesterona é capaz de induzir a ovulação em vacas e búfalas leiteiras foi parcialmente comprovada neste estudo. Os resultados obtidos demonstraram que a PGF é capaz de antecipar a ovulação, de forma sincronizada, em vacas leiteiras. Estes resultados concordam com estudos anteriores, em que foi demonstrado que PGF induz a ovulação sincronizada em vacas e novilhas submetidas a protocolos de sincronização de cio e IATF, resultando em taxa de gestação de aproximadamente 50% (PFEIFER et al., 2014).

Entretanto, aparentemente o tratamento com PGF não antecipou a ovulação em búfalas leiteiras lactantes.

Diversos estudos têm buscado elucidar como a PGF atua para induzir a ovulação em mamíferos (MURDOCH et al., 1993; RANDEL et al., 1996; BRIDGES & FORTUNE, 2007; NAOR et al., 2007). Em um estudo realizado por Leonardi et al. (2012), novilhas pré-púberes ovularam 94h após o tratamento com cloprostenol, sendo comprovado um efeito ovulatório independente da luteólise. Entretanto, o mecanismo pelo qual a PGF atua ainda não é conhecido. Aparentemente, a PGF aumenta a responsividade da hipófise ao GnRH, aumentando, assim a liberação de LH (RANDEL et al., 1996) em um processo que culmina com a ovulação. Randel et al. (1996) relatou um aumento na liberação de LH 6h após o tratamento com um análogo de PGF em vacas em anestro. Entretanto, em outro estudo, realizado com camundongos, foi demonstrado que a PGF inibe a secreção de LH pelas células hipofisárias (NAOR et al., 2007). Essas considerações evidenciam a necessidade de mais estudos para que o mecanismo de ação que leva a PGF a induzir a ovulação seja esclarecido.

Apesar de não haver consenso quanto ao mecanismo de ação da PGF, aparentemente qualquer análogo de prostaglandina possui potencial para induzir ovulação, sendo que vários análogos comerciais já foram associados a eventos periovulatórios em bovinos (CRUZ et al., 1997; GABRIEL et al., 2011; PFEIFER et al., 2009; 2014; LEONARDI et al., 2012), ovinos (DAVIES et al., 2006) e também em bubalinos (NEGLIA et al., 2008, 2012). Em um estudo prévio em que se relatou que a PGF atuava como estímulo ovulatório em vacas e novilhas submetidas a um protocolo de IATF foi usado d-Cloprostenol e Cloprostenol sódico (PFEIFER et al., 2014). No presente estudo foi utilizado d-Cloprostenol em todos os animais, entretanto, os resultados demonstram que o efeito ovulatório só ocorreu em bovinos, sendo nas búfalas constatado não haver efeito sobre a ovulação, mesmo naquelas que receberam três doses do fármaco. No Experimento 2, em que todas as vacas receberam pelo menos duas doses de PGF (Dias 7 e 8), a ovulação foi antecipada tanto nas vacas que receberam a terceira dose (Dia 9), como naquelas que não receberam, não havendo diferença entre duas ou três aplicações de PGF. Já no Experimento 3, em que as vacas receberam uma ou duas doses de PGF, notou-se que a ovulação foi antecipada somente no grupo que recebeu a segunda dose, ficando evidente a necessidade de fornecer um indutor de ovulação na fase final de crescimento folicular.

A maioria dos protocolos de sincronização de ovulação utiliza a dose luteolítica de PGF no momento da remoção da fonte de progesterona, entretanto, estudos indicam que a antecipação dessa dose resulta em melhores taxas de fertilidade (MORENO et al., 2002;

673 VALDEZ et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2010). De acordo com Sá Filho et al. (2010), a
674 luteólise precoce leva a um aumento da pulsatilidade do LH, crescimento do folículo pré-
675 ovulatório, maior taxa de ovulação e maior diâmetro do CL formado.

676 Para que boas taxas de fertilidade sejam atingidas em programas de IATF, é necessário
677 que as ovulações ocorram de forma sincronizada na maior parte das fêmeas, em um intervalo
678 de 24 horas. No Experimento 1, em que não houve diferença em nenhuma das variáveis
679 analisadas, a percentagem de búfalas que ovularam foi baixa para os Grupos CTL e PGF,
680 respectivamente. Entretanto, quando o mesmo protocolo foi aplicado em vacas lactantes, a
681 taxa média de ovulação foi de 94% (15/16), sendo que apenas uma vaca não ovulou dentro do
682 intervalo de 60-84 h. Desta forma, aparentemente a PGF não produziu estímulo ovulatório nas
683 búfalas, ao contrário do que ocorreu com as vacas. Já no Experimento 3, foi detectada
684 diferença no momento da ovulação e uma tendência na porcentagem de vacas que ovularam
685 na janela de ovulação, sendo constatado a eficácia do estímulo ovulatório na fase final de
686 crescimento do folículo dominante.

687

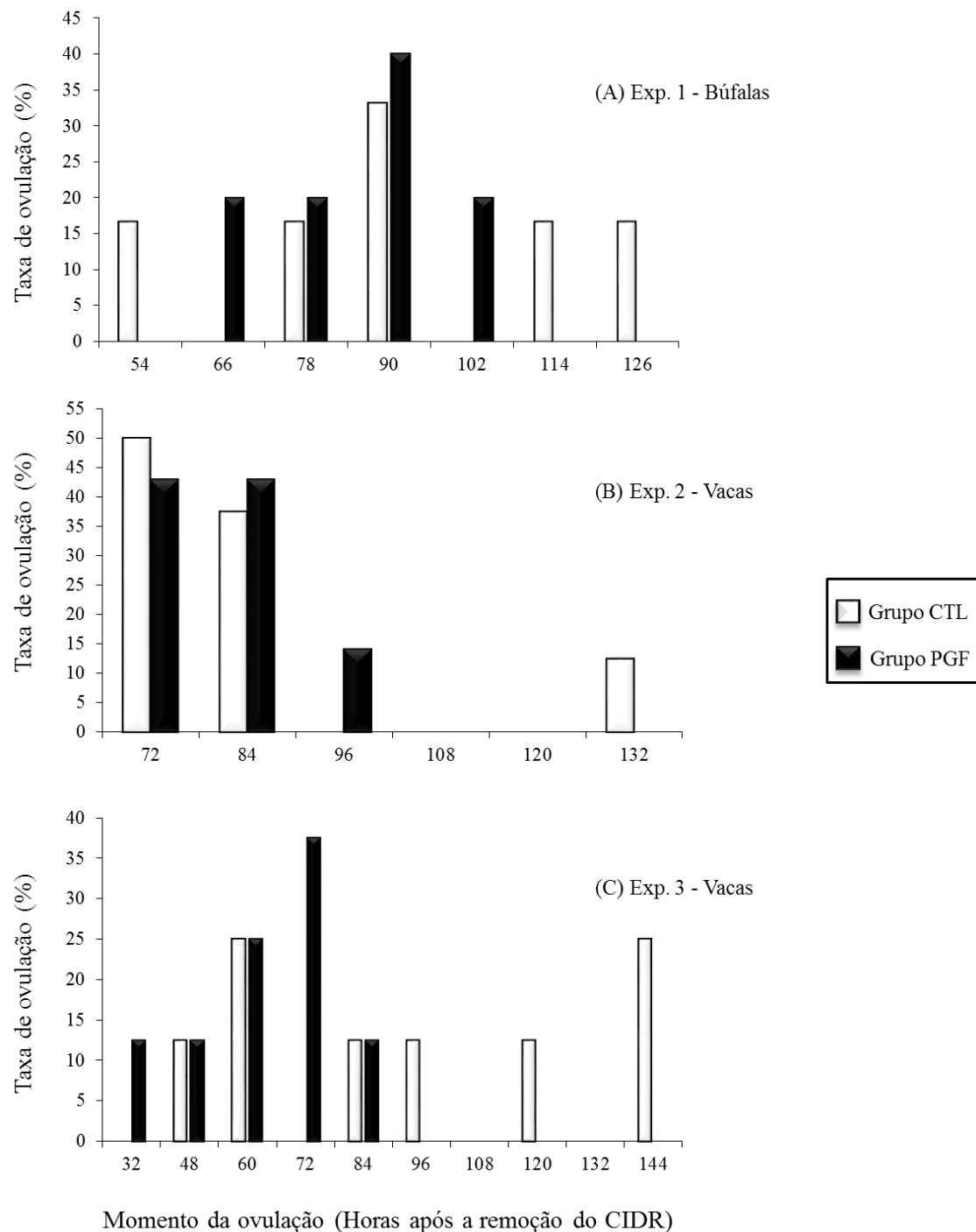


Figura 2. Distribuição e porcentagem de (A) búfalas do Experimento 1 e vacas do (B) Experimento 2 e (C) do Experimento 3 que ovularam após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona nos Grupos PGF e CTL.

Embora os dados referentes ao uso da PGF para induzir ovulação em bubalinos não tenham sido favoráveis, os resultados apresentados para bovinos demonstram a possibilidade de mais uma alternativa de indutor de ovulação para ser utilizado em programas de IATF em

bovinos, concordando com estudos anteriores, em que se demonstrou esse mesmo efeito, sem afetar a fertilidade de novilhas e vacas (PFEIFER et al., 2014). Essa alternativa é interessante uma vez que a PGF, ao contrário dos estrógenos, amplamente utilizados em protocolos de sincronização de ovulação, não possui restrições comerciais. Desde 2008, o uso do estradiol-17 β em animais de produção foi proibido pela comunidade europeia por ter sido considerado um agente carcinogênico completo pelo Comitê sobre Medidas Veterinárias Relacionadas com a Ciência para Saúde Pública (SCVPH). No Brasil, embora não haja a proibição quanto ao uso de estrógenos em reprodução animal, o período de carência no leite pode chegar a 30 dias, dependendo do produto comercial, pois seu uso pode ser um risco para a saúde humana. Assim, o uso da PGF pode ser uma alternativa em protocolos que utilizam GnRH, como forma de reduzir os custos com fármacos nos programas de IATF, particularmente nos países em que o uso de ésteres de estradiol é proibido (Diretiva 2008/97/EC). Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos no intuito de avaliar o uso da PGF em búfalas.

Em suma, os resultados apresentados sugerem que a PGF é capaz de antecipar a ovulação em vacas leiteiras submetidas a um protocolo de IATF, entretanto, quando administrada em búfalas leiteiras, mesmo três doses de d-Cloprostenol não antecipou a ovulação. Assim, fica evidente a necessidade de realizar-se mais estudos acerca do mecanismo de ação da PGF, que leva a ovulação em vacas, mas não em búfalas.

Referências

- ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 67–69, 1992.
- AVENELL, J. A.; SEEPUDIN, Y.; FLETCHER, I. C. Concentrations of LH, oestradiol 17 β and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around the time of oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 74, p. 419-424, 1985.
- BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; MOLERO-FILHO, J. R.; PORTO, R. Effecty of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 53-65, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 218-221, 2002.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animmal**, v.29, p.4-17, 2005.

- BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, p. 1-9, 2007.
- CAMELO, A. S. A.; RIBEIRO, H. F. L.; SILVA, A. O. A.; SOUZA, J. S.; VALE, W. G. Pregnancy rates in suckled female buffaloes submitted to estrous and ovulation synchronization with artificial insemination in fixed time. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., Pará, Brasil, 2002. **Proceedings...** Pará, Brasil, 2002, p. 482- 485.
- COMUNIDADE EUROPEIA. 96/22/EC., C.D. **Official Journal European Community**; L:125, 3-9, 1996.
- COMUNIDADE EUROPEIA 2002/657/EC, C.D. **Official Journal European Community**; L221, 8-36, 2002.
- CRUZ, L.C.; DO VALLE, E.R.; KESLER, D.J. Effect of prostaglandin F₂ alpha-and gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal reproduction science**, v. 49, p.135-142, 1997.
- DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; EPP, T.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.; BAGU, E.T.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Does injection of prostaglandin F₂(alpha) (PGF₂alpha) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66, p. 251-259, 2006.
- GABRIEL, H.G.; WALLENHORST, S.; DIETRICH, E.; HOLTZ, W. The effect of prostaglandin F₂(alpha) administration at the time of insemination on the pregnancy rate of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p.1-4, 2011.
- GARCIA, A.; SALAHEDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 301-307, 2001.
- GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 223-230, 1989.
- KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Characteristics of the estrous cycle of the Swamp buffalo under temperate conditions. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 593–602, 1983.
- KANAI, Y.; ABDUL-LATIEF, T.; ISHIKAWA, N.; SHIMIZU, H. Behavioural and hormonal aspects of the oestrous cycle in swamp buffaloes reared under temperate conditions. In: **Domestic Buffalo Production in Asia**. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1990, p. 113-120, 1990.
- KNOFF, L; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animals Endocrinology**, v.6, p. 111-120, 1989.
- LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F₂ α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.
- MADAN, M. L.; PRAKASH, B. S. Reproductive endocrinology and biotechnology applications among buffaloes. In: **Reproduction in Domestic Ruminants VI** p. 261–281. Ed.

- 772 JUENGEL, J.I.; MURRAY, J.F.; SMITH, M.F. Smith. Nottingham University Press,
773 Nottingham, UK, 2007.
- 774 MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects
775 of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics
776 in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 37-52, 2005.
- 777 MORENO, D.; CUTAIA, L.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; VILLATA, M. L.; CACCIA,
778 M.; BO, G. A. Effect of time of prostaglandin administration on pregnancy rates in embryo
779 recipients treated with progesterone vaginal devices and transferes without estrus detection.
780 **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 552-559, 2002.
- 781 MURDOCH, W. J.; HANSEN, T. R.; MCPHERSON, L. A. A review – role of eicosanoids in
782 vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85–115, 1993.
- 783 NAOR, Z.; JABBOUR, H. N.; NAIDICH, M.; PAWSON, A. J.; MORGAN, K.;
784 BATTERSBY, S.; *et al.* Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone
785 (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential
786 gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 524–537, 2007.
- 787 NEGLIA, G.; NATALE, A.; ESPOSITO, G.; SALZILLO, F.; ADINOLFI, L.; CAMPANILE,
788 G.; FRANCILO, M.; ZICARELLI, L. Effect of prostaglandin F2alpha at the time of AI on
789 progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes.
790 **Theriogenology**, v. 69, p. 953-960, 2008.
- 791 NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M.; DI PALO, R.; PACELLI, C.; COMIN, A.;
792 GASPARRINI, B.; CAMPANILE, G. Efficacy of PGF(2alpha) on pre-ovulatory follicle and
793 corpus luteum blood flow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 26-31,
794 Zuchthygiene, 2012.
- 795 OLIVEIRA, J. V. L.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.;
796 QUIRINO, C. R.; SALVADOR, D. F.; NOGUEIRA, L. A.G.; GUSMÃO, A. L. Efeito da
797 dosagem hormonal sobre a fertilidade e a função luteal de vacas zebras sincronizadas com
798 combinação de GnRH e Prostaglandina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25,
799 p. 323-325, 2001.
- 800 PERERA, B.M.A.O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124,
801 p.194–199, 2011.
- 802 PFEIFER, L.F.; SIQUIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.;
803 COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular
804 development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–64,
805 2009.
- 806 PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA,
807 L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSE, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF
808 2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p.
809 689-695, 2014.
- 810 PRAKASH, B. S. Influence of climate on animal reproduction. **National Workshop on**
811 **Animal-Climate Interaction**, IVRI, Izatnagar, April, 2002, p. 33–47.

RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE, M.J. Exogenous PGF(2)alpha enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.

ROLIM FILHO, S.T.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G.; PICANÇO, N.S.; BARBOSA, E.M.; FERREIRA, R.N. Desempenho reprodutivo de fêmeas bubalinas criadas em sistema misto (várzea e pastagem artificial) no estado do Pará. I. Idade a primeira cria, intervalo entre partos, época de parição, eficiência reprodutiva e taxa de prenhez. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 754-763, 2009.

ROY, K. S.; PRAKASH, B .S. Plasma progesterone, oestradiol-17 β and total oestrogen profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, p. 486-495, 2009

SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Inseminação artificial em tempo fixo. In: **Bovinocultura de Corte**. Alexandre Vaz Pires. 1ª edição, Piracicaba, FEALQ, 2010. CAP. 27, P. 259-546.

SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.

5. ARTIGO 2

Avaliação da Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em protocolos de IATF livres de estradiol

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar se um análogo de Prostaglandina F2 α (PGF) pode substituir o cipionato de estradiol (ECP) como indutor de ovulação em protocolos de IATF a base de GnRH e progesterona. No Experimento 1, em um delineamento cross-over (3 x 3), 13 vacas lactantes e 12 novilhas Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) receberam 100 μ g de Lecirelina im, associada a um implante intravaginal de liberação de progesterona no Dia 0. No Dia 7, o implante foi retirado e as fêmeas receberam 500 μ g de d-Cloprostenol (análogo de PGF) im. No Dia 8, os animais foram distribuídos homogeneamente em três grupos experimentais para receberem: 1) 2 mL de NaCl 0,9% im (Grupo CTL, n = 25), 2) 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) ou 3) 0,6 mg (novilhas) e 1 mg (vacas) de Cipionato de Estradiol i.m. (Grupo ECP, n = 23). A taxa de ovulação não diferiu entre os tratamentos (P = 0,85). Entretanto, a percentagem de fêmeas que ovularam de forma sincronizada (72 a 96 h após remoção do CIDR) foi maior no Grupo ECP do que no Grupo CTL (88 % vs. 45 %, respectivamente; P = 0,02). O momento da ovulação não diferiu entre os Grupos, ocorrendo, em média, 95 h após a remoção do implante de progesterona (P = 0,10). No Experimento 2, 32 vacas Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*), não lactantes, foram sincronizadas de forma semelhante ao Experimento 1, entretanto a PGF foi aplicada 24 horas antes da remoção do implante de progesterona (Dia 6), e não no Dia 7. No Dia 8, as vacas foram ordenadas de acordo com o diâmetro do FD e receberam: 1) 2 ml de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 15) ou 2) 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 17). A taxa de ovulação foi maior no Grupo PGF do que no Grupo CTL (P = 0,001). O momento da ovulação não diferiu entre os Grupos (P = 0,91). A porcentagem de vacas que ovularam de forma sincronizada (72 a 92 h após a remoção do implante liberador de progesterona) tendeu a ser maior nas vacas do Grupo PG do que no Grupo CTL (P = 0,1). Os resultados sugerem que apesar dos indutores hormonais PGF e ECP não diferirem do grupo controle, o uso de PGF em vacas lactantes tendeu a aumentar a sincronia das ovulações em relação aos animais que não foram induzidos a ovular. Desta forma, existe potencial de uso para PGF ser utilizada como indutor de ovulação em protocolos de IATF livres de estradiol.

Palavras-chave: Bovinos, Cipionato de estradiol, Prostaglandina, Estímulo ovulatório.

Abstract

The aim of this study was evaluate if prostaglandin F2 α analogue (PGF) can replace estradiol cypionate (ECP) as ovulatory stimulus in GnRH-progesterone based TAI protocols. In Experiment 1, in a cross-over design (3 x 3), 13 cows and 12 heifers Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) were given 100 mg of Lecirelin im plus an intravaginal progesterone-release device (CIDR) on Day 0. On Day 7, the device was removed, and the females were given 500 μ g of D-cloprostenol (PGF analog) im. On Day 8, the animals were homogeneously allocated into three groups to receive: 1) Saline (CTL Group, n = 25), 2) 500 mg of D-cloprostenol (PG Group, n = 25) or 3) 0,6 mg (heifers) and 1 mg (cows) of estradiol cypionate im (ECP Group, n = 23). The ovulation rate was not different among treatments (P = 0.85). However, the percentage of females which ovulated synchronously (24 h interval; from 72 to 96 h after CIDR removal) in the ECP Group was higher than in the CTL Group (88% vs 45%, respectively; P = 0.02). Time of ovulation did not differ between Groups (P = 0.10). In Experiment 2, 32 dairy cows, Girolando, were synchronized in a similarly to Experiment 1, but the PGF was injected on Day 6. On Day 8, the cows were separated homogeneously to receive: 1) saline 0.9% (CTL Group, n = 15) or 2) 500 mg of d-Cloprostenol (PG Group, n = 17). Ovulation rate was higher in the PGF Group than CTL Group (P = 0.001). The percentage of cows that ovulated synchronously tended to be higher in the PG Group than CTL Group (P = 0.07). In sum, although no difference in the time of ovulation was detected among treatments, PGF and ECP induced ovulation in a synchronized manner. Therefore, PGF might be a potential tool to induce ovulation in free estradiol TAI protocols.

Key-words: Cattle, Estradiol cypionate, Prostaglandin, Ovulatory stimulus.

Introdução

Os programas de controle do ciclo estral têm sido amplamente utilizados em rebanhos leiteiros com o objetivo de sincronizar a onda folicular e a ovulação de vacas e novilhas. Vários protocolos de sincronização de cio e ovulação já foram testados em gado leiteiro, apresentando resultados satisfatórios (PURSLEY et al., 1997; SANTOS et al., 2004; STEVENSON et al., 2004; RIVERA et al., 2005; PEREIRA et al., 2013). O protocolo Ovsynch, baseado na associação de duas aplicações de GnRH (Dias 0 e 9) para sincronizar o início da onda folicular e induzir a ovulação, respectivamente, e uma dose de prostaglandina

F2 α (PGF) no Dia 7, como fator luteolítico (PURSLEY et al., 1995), foi o primeiro que permitiu que os animais fossem inseminados em tempo fixo, entretanto, ao longo das duas últimas décadas, surgiram diversas modificações (PANCARCI et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2006; SELLARS et al., 2006; YILMAZBAS-MECITOGLU et al., 2014) no intuito de melhorar a eficiência e/ou reduzir os custos dos programas de IATF.

A associação de um implante de progesterona ao GnRH aplicado no Dia 0 foi uma das alterações feitas no protocolo Ovsynch que resultou em um aumento significativo nas taxas de fertilidade (AMBROSE et al., 2005). O desenvolvimento do protocolo Heatsynch, com a substituição da segunda dose de GnRH por Cipionato de estradiol (ECP; PANCARCI et al., 2002; STEVENSON et al., 2004) também representou uma alternativa importante pelo fato de reduzir custo com manejo reprodutivo (STEVENSON et al., 2004). Entretanto, o uso de ésteres de estradiol tem sofrido restrições, sendo proibido em diversos países, como os pertencentes à União Europeia e os Estados Unidos. Dessa forma, novas alternativas devem surgir para que se possa utilizar protocolos eficientes sem o uso de estradiol.

As prostaglandinas são ácidos graxos com diversas funções na reprodução animal (WEEMS et al., 2006), e são utilizadas principalmente como agente luteolítico em protocolos de IATF. Entretanto, estudos já demonstraram seu efeito sobre os níveis de LH em diversas espécies (CARLSON et al., 1973; RATNER et al., 1974; RANDERL et al., 1988, 1996). Recentemente, foi demonstrado que a aplicação de PGF é capaz de induzir a ovulação de novilhas pré-púberes (PFEIFER et al., 2009; LEONARDI et al., 2012). Todavia, o mecanismo de ação da PGF na ovulação ainda não foi esclarecido. Randerl et al. (1996) sugeriram que a PGF poderia aumentar a resposta da hipófise ao GnRH, resultando em aumento nos níveis séricos de LH. Em um estudo recente, Pfeifer et al. (2014) comprovaram que a PGF pode ser usada como indutor de ovulação em substituição a segunda dose de benzoato de estradiol (BE) em protocolos de IATF, sem prejudicar a fertilidade. Apesar da PGF ser uma alternativa para substituir os ésteres de estradiol como indutor de ovulação, ainda não há estudos que demonstrem o efeito da PGF em protocolos livres de estradiol.

Baseado nessas considerações, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o perfil ovulatório de vacas e novilhas leiteiras tratadas com um análogo de PGF em comparação com o ECP usado no protocolo Heatsynch; e 2) avaliar se antecipação da luteólise melhora a sincronização da ovulação em protocolos livres de estradiol que usam a PGF como indutor de ovulação. A hipótese testada foi a de que a PGF induz a ovulação de vacas e novilhas submetidas a protocolos livres de estradiol.

Material e Métodos

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa – Rondônia aprovou todos os procedimentos realizados neste estudo sob o código F.02/2014.

Experimento 1

Este estudo foi realizado no campo experimental do Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia (Embrapa – Rondônia), no município de Porto Velho, RO, Brasil (08°48'12" S, 63°50'56" O). Todos os animais eram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com acesso livre à água e sal mineral e em períodos de estiagem as vacas eram suplementadas com farelo de milho e soja após cada ordenha (2 vezes ao dia). Para o estudo, foram selecionadas 25 fêmeas bovinas leiteiras mestiças Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) sendo 12 novilhas púberes e 13 vacas em lactação. As novilhas tinham entre 16 e 24 meses de idade e 300 a 430 kg. As vacas apresentavam escore de condição corporal (CC) entre 2,5 e 3,5 (1 = caquética, 5 = obesa), a partir de 45 dias em lactação e produção média diária de 15 litros/dia. O Experimento foi delineado em Cross-over (3x3) (Figura 1A).

No Dia 0, todas as fêmeas receberam 100 µg de Lecirelina (análogo de GnRH, Gestran plus®, Tecnopec, São Paulo) im, e um implante intravaginal de liberação de progesterona (CIDR®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo). No dia 7, o implante foi retirado e as fêmeas receberam 500 µg de d-Cloprostenol (análogo de PGF, Croniben®, Biogénesis-Bagó, Curitiba) i.m.. No Dia 8, os animais foram distribuídos homogeneamente em três grupos experimentais para receberem: 1) 2 mL de NaCl a 0,9% i.m. (Grupo CTL, n = 25), 2) 500 µg de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) ou 3) 600µg (novilhas) e 1 mg (vacas) de Cipionato de Estradiol (E.C.P.®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo) i.m. (Grupo ECP, n = 23).

Experimento 2

Este estudo foi realizado no campo experimental do Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia (Embrapa – Rondônia), no município de Porto Velho, RO, Brasil (08°48'12" S, 63°50'56" O). Para o estudo, foram utilizadas 32 vacas leiteiras mestiças Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) não lactantes, com CC entre 3,0 e 4,0. As vacas eram mantidas a pasto com livre acesso a água. O desenho experimental está ilustrado na figura 1B. No Dia 0, todas as vacas receberam um implante intravaginal de liberação de progesterona (CIDR) associado a 100µg de Lecirelina im. No Dia 6, foi administrado 500 µg de d-Cloprostenol e 24 horas após, o implante intravaginal foi removido. No Dia 8, as vacas foram distribuídas de acordo

com o diâmetro do FD em dois grupos homogêneos que receberam: 1) 2 mL de NaCl a 0,9% (Grupo CTL, n = 15) ou 2) 500 µg de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 17).

Avaliações Ultrassonográficas e Definições

Previamente ao início dos experimentos, as fêmeas foram examinadas, duas vezes em um intervalo de 11 dias, por ultrassonografia transretal (SIUI CTS-900, probe linear com 5 MHZ, Guangdong, China) para determinar a atividade estral. Somente as vacas e novilhas que apresentavam um corpo lúteo (CL) em pelo menos um dos exames foram utilizadas no estudo.

No Experimento 1, as fêmeas foram examinadas ultrassonograficamente no dia da inserção (Dia 0) e da remoção (Dia 7) do implante intravaginal de progesterona. Após a remoção do implante intravaginal, os exames foram feitos duas vezes ao dia até o momento da ovulação ou, na ausência de ovulação, até cinco dias após a remoção do implante intravaginal. Com o objetivo de realizar a normalização dos dados de crescimento folicular (GARCIA & SALAHEDDINE, 2001), no Experimento 2, as vacas foram monitoradas diariamente do Dia 0 ao 8 e a cada exame era registrado o diâmetro e localização no ovário de todos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1989). A partir do Dia 8, o monitoramento ultrassonográfico foi realizado a cada 12 horas, assim como no Experimento 1. Os exames diários foram feitos a fim de monitorar o desenvolvimento da onda folicular de cada animal e o dia da emergência da onda folicular foi definida como retrospectivamente como o dia em que o folículo dominante foi identificado pela primeira vez, com um diâmetro de 4 a 5 mm (GINTHER et al., 1989; KNOPF et al., 1989). Em ambos os experimentos, a ovulação foi determinada pelo desaparecimento de um folículo maior ou igual a 8 mm de diâmetro (MARTINEZ et al., 2005). A sincronia das ovulações foi determinada pela porcentagem de fêmeas que ovularam dentro de um intervalo de 24 horas (72 a 96 h após a remoção do implante de progesterona).

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS (1998). Os dados referentes a variáveis contínuas (diâmetro do folículo pré-ovulatório e momento da ovulação) foram avaliados por Análise de variância – Fatorial ANOVA, sendo que as médias foram comparadas entre os grupos através do teste de Tukey. Já os dados referentes a variáveis binomiais (taxas de ovulação e ocorrência de ovulação sincronizada) foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado. No Experimento 1, análise de regressão logística foi utilizada para determinar o efeito do grupo, da categoria animal e a interação entre grupo e

categoria sobre os resultados. A taxa de ovulação sincronizada foi calculada pelo número de fêmeas que ovularam dentro do intervalo de 24 h (72 a 96h após a remoção do implante de progesterona) pelo total de ovulações de cada Grupo. Os valores foram considerados significativos quando a probabilidade (valor de P) foi menor ou igual a 0,05. Quando o valor de P foi entre 0,06 e 0,1, considerou-se uma tendência de o resultado ser causado pelo tratamento.

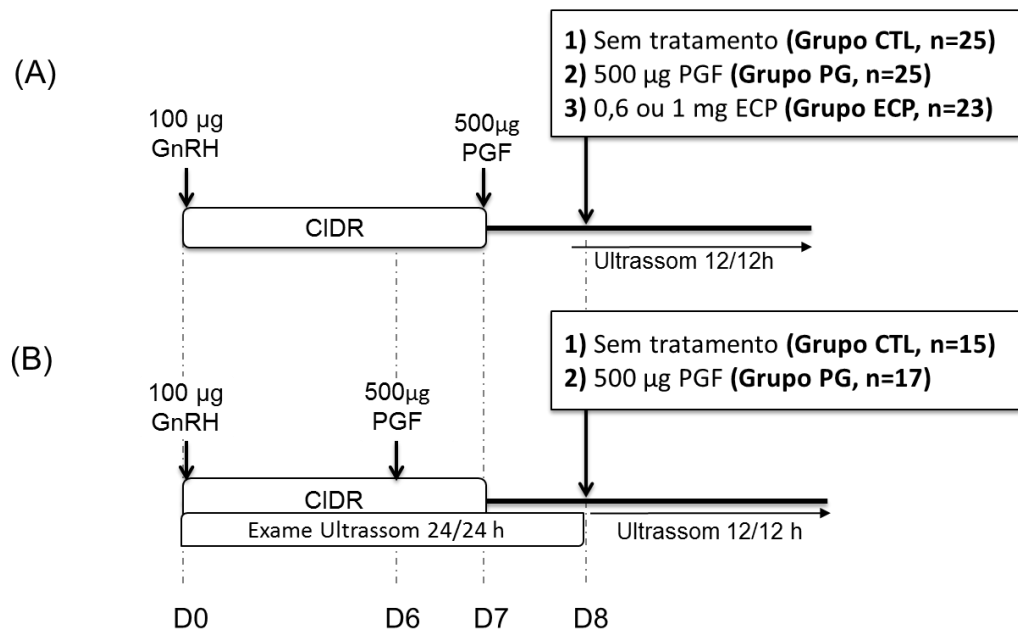


Figura 1. Desenho experimental utilizado nas (A) novilhas e vacas leiteiras do Experimento 1 e (B) vacas leiteiras do Experimento 2.

Resultados

Experimento 1

Os resultados das respostas ovarianas de acordo com o tratamento estão descritos na Tabela 1. Na última réplica do experimento, duas fêmeas (uma vaca e uma novilha) do Grupo ECP apresentaram lesão na mucosa retal e, portanto, foram excluídas do experimento. As fêmeas dos Grupos CTL e PG tiveram 80% de taxa de ovulação enquanto que as fêmeas que receberam ECP tiveram 74% ($P = 0,23$). Entretanto, a porcentagem de fêmeas que ovularam de forma sincronizada foi maior Grupo ECP (88%) do que no Grupo CTL (45 %; $P = 0,02$). Do total de ovulações do Grupo PG, 70% ocorreram de forma sincronizada, não diferindo dos demais grupos ($P > 0,05$). O momento de ovulação das fêmeas de acordo com o estímulo

ovulatório está descrito na Figura 2. As fêmeas ovularam, em média, 95 horas após a remoção do implante de progesterona, não sendo detectada diferença entre os Grupos ($P > 0,05$).

Nas vacas, o diâmetro do folículo pré-ovulatório foi maior nos Grupos CTL e PG do que no Grupo ECP ($P < 0,05$; Tabela 1). Ao desconsiderar a categoria animal, verificou-se que o diâmetro do folículo pré-ovulatório nas fêmeas que receberam tratamento com PGF não diferiu dos Grupos CTL e ECP, todavia, as fêmeas do Grupo CTL apresentaram maior diâmetro folicular do que as do Grupo ECP ($P = 0,002$).

Tabela 1. Momento da ovulação, taxas de ovulação e de ovulações sincronizadas e diâmetro do folículo ovulatório em vacas e novilhas leiteiras tratadas com 2 ml de NaCl a 0,9% (Grupo CTL, $n = 25$), 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, $n = 25$) e 0,6 mg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de Cipionato de estradiol (Grupo ECP, $n = 23$).

Respostas ovarianas	Tratamento			Valor de P		
	CTL	PG	ECP	Grupo	Categoria	Categ*Grupo
Momento da ovulação h (amplitude)*	101,0 \pm 4,7 (60 – 156 h)	96,0 \pm 4,6 (72 – 132 h)	86,1 \pm 5,0 (60 – 132h)	0,10	0,54	0,89
Taxa de ovulação	80% (20/25)	80% (20/25)	74% (17/23)	0,23	0,90	0,21
Taxa de ovulação sincronizada (72-96 h)	45% (9/20)	70% (14/20)	88% (15/17)	0,02	0,93	0,72
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)*	14,3 \pm 0,4 ^a	13,9 \pm 0,4 ^a	12,3 \pm 0,4 ^b	0,002	0,67	0,51

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam que as médias são diferentes entre si ($P \leq 0,05$).

*Os dados estão apresentados em forma de Média \pm Erro Padrão.

Experimento 2

Os resultados das respostas ovarianas estão descritos na Tabela 2. O momento da ovulação não diferiu entre os Grupos ($P = 0,91$). A taxa de ovulação foi maior no Grupo PG do que no Grupo CTL [100 % (17/17) vs. 53 % (8/15), respectivamente; $P = 0,001$] e houve uma tendência de as ovulações ocorrerem de forma mais sincronizada nas vacas do Grupo PG do que no Grupo CTL ($P = 0,1$).

Tabela 2. Porcentagem de vacas que ovularam durante o tratamento, porcentagem de ovulações sincronizadas, momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e diâmetro do folículo ovulatório em vacas que receberam tratamento com PGF (Grupo PG, n = 17) ou NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 15).

Respostas ovarianas	Grupo CTL	Grupo PG	Valor de P
Taxa de ovulação	53,3% (8/15)	100 % (17/17)	0,001
Taxa de ovulação sincronizada (72 – 96h)	37,5% (3/8)	70,6% (12/17)	0,10
Momento da ovulação (amplitude)	85,5 ± 7,18 (60 – 132 h)	86,6 ± 4,92 (72 – 120 h)	0,90
Diâmetro do folículo ovulatório*	14,3 ± 0,70	14,2 ± 0,56	0,90

*Os dados estão apresentados em forma de Média ± Erro Padrão.

Discussão

A hipótese de que a PGF seria capaz de induzir a ovulação de forma sincronizada em um protocolo livre de estradiol foi parcialmente comprovada neste estudo. Entretanto, a sua capacidade de induzir a ovulação em vacas e novilhas foi comprovada. A capacidade da PGF de induzir a primeira ovulação em novilhas já foi demonstrada (PFEIFER et al., 2009; LEONARDI et al., 2012). Além disso, a PGF já demonstrou ser um eficiente indutor de ovulação quando comparado ao ECP e BE em programas de IATF (PFEIFER et al., 2014). Entretanto, este é o primeiro estudo em que se utilizou PGF para sincronizar a ovulação em um protocolo livre de estradiol.

O ECP é um potente indutor de cio e ovulação, muito utilizado nos protocolos de IATF aplicados no Brasil, sendo reportadas taxas de ovulação em torno de 80 % (GALVÃO et al., 2004; STEVENSON et al., 2004). De forma semelhante, neste estudo, detectou-se taxa de 74 % nas fêmeas tratadas com ECP (Experimento 1), sendo que as fêmeas tratadas com PGF apresentaram 80% de ovulação. Como os resultados referentes a taxa e momento da ovulação não diferiram entre as fêmeas que receberam ECP ou PGF, o Grupo ECP foi excluído do Experimento 2.

Entre as vantagens do uso de ésteres de estradiol 17-β estão a indução das manifestações de cio e o baixo custo (STEVENSON et al., 2004), sendo esta a principal razão para substituição da segunda dose de GnRH no protocolo *Ovsynch*. Devido a potente indução do cio pelo ECP, o protocolo foi denominado *Heatsynch* (PANCARCI et al., 2002; STEVENSON et al., 2004). Entretanto, é observado que muitas vezes a manifestação do cio causado por ésteres de estradiol não é seguida de ovulação, sendo o “falso cio” uma das limitações ao uso destes fármacos. Além disso, devido ao seu poder residual em produtos

cárneos e lácteos, o uso de estradiol e seus ésteres em produção animal é proibido em alguns países, impossibilitando a aplicação do protocolo *Heatsynch* (SCHMIDT et al., 2013). Por essa razão é necessário que protocolos livres de estradiol e de baixo custo sejam desenvolvidos.

A Prostaglandina F2 α é um eicosanoide derivado do ácido aracdônico amplamente utilizado em reprodução animal e muito estudado por suas variadas ações (WEEMS et al., 2006). Diversos estudos já demonstraram a associação da PGF exógena ao aumento nas concentrações de LH em ovelhas (CARLSON et al., 1973), camundongos (RATNER et al., 1974) e vacas (RANDEL et al., 1996). Embora já seja bem estabelecido que a produção de PGF produzida pelo FD é essencial para a ovulação em ruminantes (SILVA & REEVES 1985; MURDOCH et al., 1986, ALGIRE et al., 1992), o mecanismo exato pelo qual a PGF induz a ovulação ainda não foi esclarecido. Entretanto, Randel et al. (1996) sugeriram que a ação ocorre no eixo hipófise-hipotálamo, em que a PGF induz um aumento da capacidade de resposta da hipófise ao GnRH liberado pelo hipotálamo, estimulando a maior liberação de LH, que culminará na ovulação. Em outro estudo, foi sugerido que a PGF produz um efeito direto na adenohipófise (WEEMS, 2006). Já foi demonstrado as prostaglandinas são mediadores intraovarianos de alguns eventos periovulatórios relacionados com o pico de gonadotropina (MURDOCH & McCORMICK, 1993), parecendo desempenhar um papel crítico na ruptura folicular. Ao trabalhar com ovelhas em anestro, Davies et al. (2006) sugeriram que a PGF exógena causa ovulação por um efeito direto da PGF a nível ovariano, sem relação com o declínio nas concentrações de progesterona.

Em um programa de sincronização de ovulação para IATF, um fator essencial para o sucesso dos resultados é a percentagem de fêmeas que ovulam dentro de um pequeno intervalo, que pode variar de acordo com o protocolo estabelecido. De acordo com Saacke (2008), a ovulação ocorre cerca de 30 horas após o início do cio, sendo que o momento mais adequado para a inseminação é 24 horas após o início do cio, que corresponderá a cerca 6 horas antes da ovulação, pois nesse momento, tanto a taxa de fertilização como a qualidade embrionária serão otimizadas. Em um trabalho com novilhas da raça Holandês, Garcia e Salahedine (2001) estabeleceram que a sincronia na ovulação é definida como a proporção de fêmeas que ovularam entre 60 e 84 horas após a remoção do implante de progesterona e injeção de prostaglandina em um protocolo baseado no uso de estradiol e progesterona. O momento mais adequado pode variar de acordo com o protocolo aplicado, entretanto, a maioria das ovulações devem ocorrer dentro de um intervalo máximo de 24 horas. No Experimento 2, em protocolos livre de estradiol, as vacas que receberam tratamento com PGF

tenderam a ovular de forma mais sincronizada do que as vacas que não receberam estímulo ovulatório. Conforme mostra a Figura 2, apenas duas vacas do Grupo CTL ovularam em um intervalo de 24 horas, correspondente ao intervalo de 72 a 96 horas, o qual consideramos ideal para este protocolo.

De acordo com Macmillan & Peterson (1993) a taxa de desenvolvimento folicular após a indução do declínio nos níveis de progesterona plasmática constitui o principal fator limitante para que ocorra sincronia entre o estro e a ovulação. Dessa forma, a indução da luteólise previamente a remoção do implante intravaginal permite a aceleração no declínio de progesterona, favorecendo o desenvolvimento do folículo dominante. A luteólise precoce leva a um aumento da pulsatilidade do LH, do crescimento do folículo pré-ovulatório, maior taxa de ovulação e maior diâmetro do CL formado (SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2010). Assim, no Experimento 2, se preconizou que a dose luteolítica de PGF fosse antecipada em um dia para potencializar a ação ovulatória da segunda dose de PGF. Assim, constatou-se que aparentemente houve maior sincronia nas ovulações, em comparação com o experimento em que a PGF foi administrada no momento da retirada da fonte de progesterona.

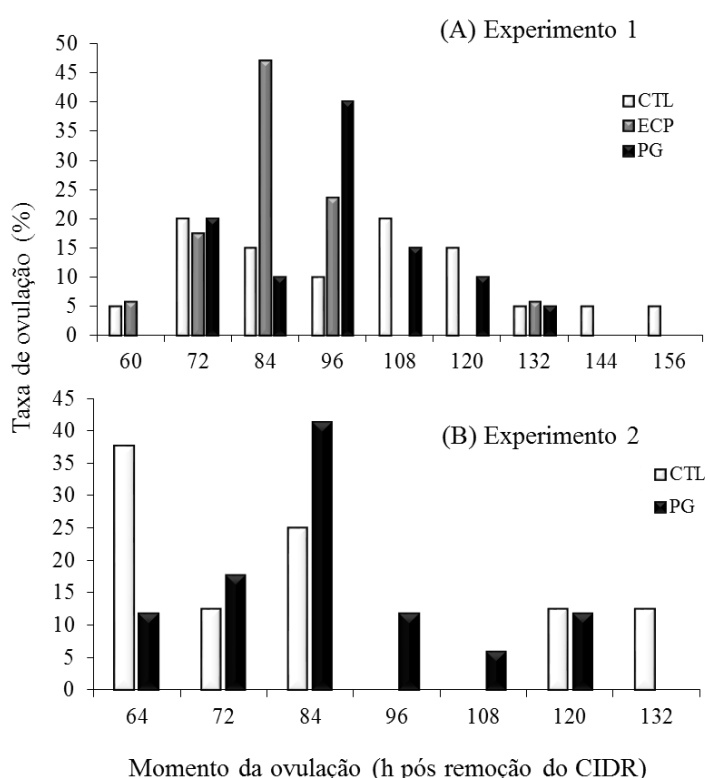


Figura 2. Percentagem e distribuição do momento da ovulação de fêmeas *Bos taurus* vs. *Bos indicus* leiteiras tratadas com (A) 2 mL de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 25), 500µg de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) e 600µg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de Cipionato de estradiol no Experimento 1 e (B)

nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 15) ou 500 µg de de Cloprostenol (Grupo PG, n = 17) no Experimento 2.

No Experimento 1, tanto as vacas que receberam PGF para induzir a ovulação como as que não receberam nenhum estímulo ovulatório apresentaram maior diâmetro do folículo ovulatório do que as fêmeas que receberam ECP. Em um estudo realizado para avaliar o efeito da PGF como indutor de ovulação em vacas e novilhas leiteiras submetidas a IATF com o uso de um protocolo baseado na associação de progesterona e BE no Dia 0, Pfeifer et al. (2014) também relataram menor diâmetro do folículo ovulatório naquelas que receberam BE ou ECP como indutor de ovulação em comparação com novilhas tratadas com PGF, sendo essa diferença atribuída ao mecanismo de ação de cada indutor de ovulação (PFEIFER et al., 2014). No presente estudo, nas fêmeas que não receberam estímulo ovulatório, a ovulação ocorreu de forma natural, enquanto que a administração exógena do ECP resulta na ovulação por um mecanismo de antecipação do pico de LH (LAMMOGLIA et al., 1998), antecipando a ovulação. Por outro lado, embora o mecanismo pelo qual a PGF induz a ovulação ainda não esteja claro, provavelmente a PGF permite o crescimento do folículo por um período mais longo do que o que ocorre com o éster de estradiol (PFEIFER et al., 2014).

Neste estudo, buscou-se uma alternativa para que os ésteres de estradiol fossem retirados dos protocolos de sincronização de cio utilizados no Brasil. Os protocolos baseados na sequência de GnRH + P4, PGF, GnRH são atualmente os mais utilizados nos rebanhos leiteiros dos Estados Unidos e nos países da Europa. Esse fato se deve à restrição na utilização de estrógenos naqueles países, sendo bastante discutida em produção animal, principalmente no que se refere a segurança alimentar. Embora não haja estudos que demonstrem os efeitos, a longo prazo, da ingestão de alimento de origem animal contendo resíduos de estradiol-17β ou de seus ésteres, o Comitê Científico do Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) considerou que este estrógeno, quando usado com o objetivo de promover crescimento animal e de controlar o ciclo estral, atua como um agente carcinogênico completo, pois tem efeito como iniciador e promotor de crescimento tumoral. Dessa forma, o uso de estradiol-17α e seus ésteres foi proibido em diversos países, como os da União Europeia (COMUNIDADE EUROPEIA, 2002) e os Estados Unidos, incluindo aqueles com fins terapêuticos.

Dessa forma, mesmo que o uso do estradiol ainda seja permitido em alguns países, como o Brasil, a alternativa de substituí-lo por análogos de PGF se torna promissora, pois favorece competitividade dos produtos de origem animal perante o mercado mundial. Além

disso, conforme consta na bula de alguns produtos comerciais à base de estradiol, existe um período de carência muito variável, talvez pela falta de informações acerca dos efeitos dos resíduos, especialmente no leite de vacas tratadas com estradiol, podendo esse período ser de até 30 dias. Se esse período fosse respeitado, isso representaria um considerável prejuízo com o descarte de leite. Desta forma, os protocolos livres de estradiol e que utilizam PGF para induzir a ovulação demonstram ser promissores, pois no presente estudo, protocolos que utilizaram PGF não diferiram dos protocolos que utilizam ECP como indutor de ovulação. Entretanto, mais estudos que avaliem a fertilidade devem ser realizados para comprovar a eficiência desses protocolos em programas de IATF para rebanhos leiteiros.

Em suma, a nossa hipótese de que a PGF pode ser usada para induzir a ovulação em protocolos derivados de *Ovsynch* foi parcialmente comprovada. A PGF é capaz de substituir os ésteres de estradiol, induzindo a ovulação de forma igualmente sincronizada, além de permitir que o folículo pré-ovulatório atinja um diâmetro maior do que o que ocorre com o ECP.

Referências

- ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**. v. 56, p. 67–69, 1992.
- CARLSON, J.C.; BARCIKOWSKI, B.; MCCracken, J.A. PGF $_{2\alpha}$ and the release of LH in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 357-361, 1973.
- COMUNIDADE EUROPEIA, 2002/657/EC, C.D., Off J Eur Comm 2002; L221: p. 8-36.
- DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; EPP, T.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.; BAGU, E.T.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Does injection of prostaglandin F(2alpha) (PGF $_{2\alpha}$) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66, p. 251-259, 2006.
- GARCIA, A.; SALAHEDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 301-307, 2001.
- GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 223-230, 1989.
- KNOFF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animals Endocrinology**, v.6, p. 111-120, 1989.
- LAMB, G. C., J. S. STEVENSON, D.J. KESLER, H.A. GARVERICK, D. R. BROWN, B. E. SALFEN. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F $_{2\alpha}$

- 1208 for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 79, p.
1209 2253–2259, 2001.
- 1210 LAMMOGLIA MA, SHORT RE, BELLOWS SE, BELLOWS RA, MACNEIL MD, HAFS
1211 HD. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in
1212 peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-
1213 releasing insert and prostaglandin F₂α. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1662-1670,
1214 1998.
- 1215 LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.;
1216 PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F₂α promotes ovulation in
1217 prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.
- 1218 MACMILLAN, K.L.; PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for
1219 cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rate and the treatment of
1220 post-partum anestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 1-25, 1993.
- 1221 MURDOCH, W. J.; PETERSON, T.A.; VAN KIRK, E. A.; VINCENT, D. L.; INSKEEP,
1222 E.K. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory
1223 mechanism of the ewe. **Biology Reproduction**, v. 35, p. 1187–1194, 1986.
- 1224 MURDOCH, W.J.; McCORMICK, R.J. Mechanisms and physiological implications of
1225 leucocyte chemoattraction into periovulatory ovine follicles. **Journal of Reproduction and**
1226 **Fertility**, v. 97, p. 375-380, 1993.
- 1227 PANCARCI, S.M.; JORDAN, E.R.; RISCO, C.A.; SCHOUTEN, M.J.; LOPES, F.L.;
1228 MOREIRA, F.; THATCHER, W.W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized
1229 timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85,
1230 p. 122–31, 2002.
- 1231 PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA,
1232 L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSE, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF
1233 2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p.
1234 689-695, 2014.
- 1235 PURSLEY, J. R., M. O. MEE, AND M. C. WILTBANK. Synchronization of ovulation in
1236 dairy cows using PGF₂α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.
- 1237 PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of
1238 lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n.
1239 2, p. 301-6, 1997.
- 1240 RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE,
1241 M.J. Exogenous PGF₂α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows.
1242 **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.
- 1243 RATNER A, WILSON MC, STRIVASTAVA L, PEAKE GR. Stimulatory effect of PGE₂ on
1244 rat anterior pituitary cyclic AMP and luteinizing hormone release. **Prostaglandins**, v. 5, p.
1245 165-171, 1974.
- 1246 SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, n.70, p.
1247 479-484, 2008
- 1248 SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Inseminação artificial em tempo fixo. In:
1249 **Bovincultura de Corte**. Alexandre Vaz Pires. 1ª edição, Piracicaba, FEALQ, 2010. cap. 27,
1250 p. 529-546.

- 1251 SCHMIDT, C.; GAJEWSKI, Z.; WEHREND, A. Strategische hormonelle
1252 Fruchtbarkeitsprogramme bei Kühen. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, n. 1, 2013.
- 1253 SELLARS, C.B.; DALTON, J.C.; MANZO, R.; DAY, J.; AHMADZADEH, A. Time and
1254 incidence of ovulation and conception rates after incorporating estradiol cypionate into a
1255 timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 620-626, 2006.
- 1256 SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of**
1257 **Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.
- 1258 STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; LUCY, M.C. Use of Estradiol Cypionate as a
1259 Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. **Journal of**
1260 **Dairy Science**, v. 87, p. 3298–3305, 2004.
- 1261 WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female
1262 farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.
- 1263 YILMAZBAS-MECITOGLU, G.; KARAKAYA, E.; KESKIN, A.; GUMEN, A.; KOC,
1264 V.; OKUT, H. Comparison of synchronisation and fertility after different modifications of the
1265 ovsynch protocol in cyclic dairy cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 62, p. 64-73, 2014.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, juntamente com os dados dos estudos apresentados, é possível afirmar que a Prostaglandina F2 α exógena induz a ovulação em novilhas e vacas. Além disso, o d-Cloprostenol, análogo testado nos experimentos deste estudo, pode ser uma alternativa viável para substituir o ECP usado nos protocolos *Heatsynch*, induzindo a ovulação de forma igualmente sincronizada, além de permitir que o folículo pré-ovulatório atinja um diâmetro maior do que o que ocorre com o ECP. Entretanto, neste estudo não foi possível verificar as taxas de gestação resultantes do protocolo proposto, sendo necessária a aplicação do mesmo em um rebanho comercial afim de que seja demonstrada a eficiência do protocolo.

A PGF é capaz de antecipar a ovulação em vacas leiteiras submetidas a um protocolo de IATF, entretanto, quando administrada em búfalas leiteiras, mesmo três doses de d-Cloprostenol não antecipou a ovulação. Assim, fica evidente a necessidade de realizar-se mais estudos acerca do mecanismo de ação da PGF, que leva a ovulação em vacas, mas não em búfalas.

A aplicação comercial de protocolos livres de ésteres de estradiol possibilitará que novas alternativas hormonais para inseminar novilhas e vacas em tempo-fixe estejam disponíveis para os profissionais que atuam no mercado e para difusão tecnológica. A obtenção destes resultados favorece a utilização de protocolos hormonais para controle do ciclo estral sem a dependência de ésteres de estradiol, proibidos nos mercados mais exigentes. Dessa forma, o sistema de produção pecuária pode estar mais conectado com as exigências mercadológicas internacionais e com uma produção mais sustentável e lucrativa. Além disso, a disponibilização de protocolos de IATF que utilizam PGF em substituição ao GnRH pode representar um preço mais competitivo para protocolos de IATF o que estimula o uso das tecnologias da reprodução, mesmo nos países em que o uso de ésteres de estradiol em produção animal ainda é permitido.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

- ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**. v. 56, p. 67–69, 1992.
- ANDERSON, L. H.; DAY, M. L. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol acetate. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2955-2961, 1994.
- AVENELL, J. A.; SEEPUDIN, Y.; FLETCHER, I. C. Concentrations of LH, oestradiol 17 β and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around the time of oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 74, p. 419-424, 1985.
- AYRES, H.; PENTEADO, L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com implante de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 410, 2006.
- BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; MOLERO-FILHO, J. R.; PORTO, R. Effecty of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 53-65, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproductive Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES M. O. Técnicas de manejo para aperfeiçoar a eficiência reprodutiva em fêmeas Bos indicus. Botucatu: **Unesp**, 2004b.
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; MARQUES, M.O.; PENTEADO, L.; BÓ, G.A. Aplicação integrada de programas de controle da ovulação e manejo reprodutivo em bovinos de corte em condições extensivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 7., Córdoba. **Anais...** Córdoba: IRAC – Instituto de Reproducción Animal, 2007, v. 1, p. 55-79.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animmal**, v.29, p.4-17, 2005.
- BIHEL, M. V. **Avaliação de estratégias para aumentar a fertilidade de fêmeas nelore submetidas a protocolos de sincronização**. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.
- BÓ, G.A., ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, CUTAIA, D.L., CACCIA, M., TRIBULO, R., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, n.57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal and Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em 23 jul 2013.

BRIDGES, P.J., LEWIS, P.E., WAGNER, W.R. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p.573- 583, 1999.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Progesterone mediates gonadotrophin-induced secretion of prostaglandins E and F_{2a} (PGE, PGF) by follicular cells from bovine preovulatory follicles [Abstract]. **Biology of Reproduction**, v. 68 (Suppl 1), p. 47, 2003.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, p. 1-9, 2007.

BRIDGES, G.A.; DAY, M.L.; PIRES, A. V. Aspectos fisiológicos da reprodução de fêmeas bovinas e otimização da sincronização do estro e da ovulação, In: **PIRES, A. V. Bovinocultura de Corte. Piracicaba: FEALQ**, Cap. 34, p. 667-682, Piracicaba, 2010.

BURKE, C.R.; DAY, M.L.; BUNT, C.R.; MACMILLAN, K.L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 145-151, 2000.

COMUNIDADE EUROPEIA. 96/22/EC., C.D. **Official Journal European Community**; L:125, 3-9, 1996.

COMUNIDADE EUROPEIA 2002/657/EC, C.D. **Official Journal European Community**; L221, 8-36, 2002.

COOPER, M.J.; FURR, B.J. Control of oestrus cycle of heifers with synthetic prostaglandin analogue. **Veterinary Record**, v. 94, p. 61, 1974.

CRUZ, L.C; DO VALLE, E.R.; KESLER, D.J. Effect of prostaglandin F₂ alpha-and gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 135-142, 1997.

DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; EPP, T.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.; BAGU, E.T.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Does injection of prostaglandin F₂(alpha) (PGF₂alpha) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66, p. 251-259, 2006.

DEJARNETTE, J.M.; DAY, M.L.; HOUSE, R.B.; WALLACE, R.A.; MARSHALL, C.E. Effect of GnRH pretreatment on reproductive performance of postpartum suckled beef cows following synchronization of estrus using GnRH and PGF. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1675-1682, 2001.

DESCOUTEAUX, L.; COLLOTON, J.; GNEMMI, G. **Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasound.**, Ed. Wiley-Blackwel, 2010. ISBN-13:978-0-8138-1551-0/2010.

DOUGLAS, R.; GINTHER, O.J. Effect of prostaglandina F2 α on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, v. 2, p. 265-271, 1972.

EL-ZARKOUNY, S.Z.; CARTMILL, J.A.; HENSLEY, B.A.; STEVENSON, J.S. Presynchronization of estrous cycles before Ovsynch and progesterone in dairy cows: Ovulation, pregnancy rates, and embryo survival. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 1024-1037, 2004.

FAOSTAT data. [2011]. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> Acesso em 22 de julho de 2013.

FERNANDES, A. C. F.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.406-414, jul./set. 2007. Acessado em 10 de fevereiro de 2014. Disponível em www.cbra.org.br

FORTUNE, J.E.; WILLIS, E.L.; BRIDGES, P.J.; YANG, C.S. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 6, p. 60-71, 2009.

GARCIA, A.; SALAHEDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 301-307, 2001.

GEARY, T.W.; DOWNING, E.R.; BRUEMMER, J.E.; WHITTIER, J.C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to Select Synch estrous synchronization protocol. **The Professional Animal Scientist**, v. 16, p. 1-5, 2000.

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 223-230, 1989.

GOTTSCHALL, C. S. **Desmame de terneiros de corte. Como? Quando? Por quê?** Ed. Agropecuária, Guaíba. p. 139, 2002.

HUMBLLOT, P.; GRIMARD, B.; MIALOT, J. P. Sources of variation of postpartum cyclicity, ovulation and pregnancy rates in suckled beef cows treated with progestagen and PMSG. **Proceedings of Society. Theriogenology Meeting**, Kansas City, USA, p.36-45.1996.

JOCHLE, W. Forty years of control of the oestrous cycle in ruminants: progress made, unresolved problems and the potential impact of sperm encapsulation technology. **Reproduction and Fertility Development**, v. 5, p. 587-594, 1993.

KASIMANICKAM, R.; COLLINS, J.C.; WUENSCHALL, J.; CURRIN, J.C.; HALL, J.B.; WHITTIER, W. D. Effect of timing of prostaglandin administration, controlled internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone administration on pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 166-172, 2006.

KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F2a treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169-180, 1990.

KNOPF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animals Endocrinology**, v.6, p. 111-120, 1989.

KOTWICA J, BOGACKI M, REKAWIECKI R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 5341, p.1-10, 2002.

LAMMOGLIA MA, SHORT RE, BELLOWS SE, BELLOWS RA, MACNEIL MD, HAFS HD. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in periparturient heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2alpha. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1662-1670, 1998.

LARSON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.

MACMILLAN, K.L.; PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rate and the treatment of post-partum anestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 1-25, 1993.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of estrus cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 307-320, 1996.

MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas Bos taurus taurus x Bos taurus indicus no período pós-parto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba. **Anais...** Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba, 2003, p. 392.

MARQUES, M.O.; AYRES, H.; REIS, E.L.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Efeito do Cipionato e do Benzoato de estradiol na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 32, p. 222. 2004.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COOK, R.B.; OLSON, W.O.; MAPLETOFT, R.J. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 1049-1059, 2002.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 37-52, 2005.

MCCRACKEN, J.A.; CARLSON, J.C.; GLEW, M.E.; GODING, J.R.; BAIRD, D.T.; GRÉEN, K.; SAMUELSSON, B. Prostaglandin F₂ identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nature: New Biology**, v. 238, n.83, p. 129-134, 1972.

MIHM, M.; BAGUISI, A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 123-130, 1994.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Valera, São Paulo, 2002.

MOREIRA, F., ORLANDI, C.; RISCO, C.; LOPES, F.; LOPES; MATTOS, R.; THATCHER, W.W. Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin: cyclic versus anestrus cows. **Journal of Animal Science**, v. 78(Suppl. 1), p. 134 (Abstr.), 2000.

MURDOCH, W. J.; PETERSON, T.A.; VAN KIRK, E. A.; VINCENT, D. L.; INSKEEP, E.K. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology Reproduction**, v. 35, p. 1187-1194, 1986.

MURDOCH, W.J.; McCORMICK, R.J. Mechanisms and physiological implications of leucocyte chemoattraction into periovulatory ovine follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 375-380, 1993.

MURDOCH, W.J.; HANSEN, T.R.; MCPHERSON, L.A. A review - role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85-115, 1993.

NAOR, Z.; JABBOUR, H.N.; NAIDICH, M.; PAWSON, A. J.; MORGAN, K.; BATTERSBY, S.; MICHAEL, MILLAR, M.R.; BROWN, P.; MILLAR, R.P. Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 524-537, 2007.

NEBEL, R.L.; DRANSFIELD, M.G.; JOBST, S.M.; BAME, J.H. Automated electronic systems for detection of estrus and timing of AI in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.713-23, 2000.

NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M.; DI PALO, R.; PACELLI, C.; COMIN, A.; GASPARRINI, B.; CAMPANILE, G. Efficacy of PGF₂(α) on pre-ovulatory follicle and corpus luteum blood flow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 26-31, Zuchthygiene, 2012.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 817-830, 1990.

PANCARCI, S.M.; JORDAN, E.R.; RISCO, C.A.; SCHOUTEN, M.J.; LOPES, F.L.; MOREIRA, F.; THATCHER, W.W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.122–31, 2002.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINEZ, C.M.; GIMENES, L.U.; AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. Variação na taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 260, 2005.

PEREIRA, M.H.; SANCHES, C.P.; GUIDA, T.G.; RODRIGUES, A.D.; ARAGON, F.L.; VERAS, M.B.; BORGES, P.T.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Timing of prostaglandin F2alpha treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2837-2846, 2013.

PFEIFER, L.F.; SIQUIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–64, 2009.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF 2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 689-695, 2014.

PURSLEY, J. R., M. O. MEE, AND M. C. WILTBANK. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.

PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301-6, 1997.

RANDEL, R.D.; DEL VECCHIO, R.P.; NEUENDORFF, D.A.; PETERSON, L.A. Effect of alfaprostol on postpartum reproductive efficiency in Brahman and heifers. **Theriogenology**, v. 29, p. 657- 670, 1988.

RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE, M.J. Exogenous PGF(2)alpha enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.

RATNER, A.; WILSON, M.C.; STRIVASTAVA, L.; PEAKE, G.R. Stimulatory effect of PGE, on rat anterior pituitary cyclic AMP and luteinizing hormone release. **Prostaglandins**, v. 5, p. 165-171, 1974.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RIVERA, H.; LOPEZ, H.; FRICKE, P.M. Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed AI and for synchronizing return to estrus in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 957-968, 2005.

SACCKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 663–677, 2000.

SAACKE, R. G. Insemination factors realated to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v.70, p. 479-484, 2008

SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Inseminação artificial em tempo fixo. In: **Bovinocultura de Corte**. Alexandre Vaz Pires. 1º edição, Piracicaba, FEALQ, 2010. cap. 27, p. 529-546.

SANTOS, J.E.; BARTOLOME, J.A.; CERRI, R.L.; JUCHEM, S.O.; HERNANDEZ, O.; TRIGG, T.; THATCHER, W.W. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p. 421-435, 2004.

SCHMIDT, C.; GAJEWSKI, Z.; WEHREND, A. Strategische hormonelle Fruchtbarkeitsprogramme bei Kühen. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, n. 1, 2013.

SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.

STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; LUCY, M.C. Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3298–3305, 2004.

THATCHER, W. W.; K. L., MACMILLAN; P. J., HANSEN; M, DROST. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Thenogenology**, v. 31, p.149, 1989.

TSAI, S.; WILTBANK, M.C. ProstaglandinF2 α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1016-1022, 1997.

VASCONCELOS, J. L., R. SARTORI, H. N. OLIVEIRA, J. G. GUENTHER, AND M. C. WILTBANK. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307– 314, 2001.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; FERNANDES, C.A.C. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.257-262, 1999.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WILTBANK, J. N.; STURGES, J. C.; WIDEMAN, D.; LEFEVER, D. G.; FAULKNER, L. D. Control of estrus and ovulation using subcutaneous implants and estrogens in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 33, n.3, p. 600-6, 1971.

ZIMBELMAN, R. G.; SMITH, L. W. Control of ovulation in cattle with melengestrol acetate. I. Effect of dosage and route of administration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 2, p. 185-91, 1996.

ZOR, A.; KANEKO, T.; SCHNEIDER, H.P.G.; MCCANN, S.M.; FIELD, J.B. Further studies on stimulation of anterior pituitary cyclic adenosine-3,5'-monophosphate formation by the hypothalamic extract and prostaglandins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 2883-2885, 1970.